

Charakterisierung von humanem PI31 und neuen alternativen Spleißvarianten des PI31 Gens *PSMF1*

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Humboldt-Universität zu Berlin

von

Herrn Diplom-Biochemiker Tobias Schwarz

geboren am 21.03.1977 in Hoyerswerda

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin:

Prof. Dr. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I:

Prof. Dr. Lutz-Helmut Schön

Gutachter:

1. Prof. Dr. Peter-Michael Kloetzel
2. Prof. Dr. Burkhardt Dahlmann
3. Prof. Dr. Wolfgang Lockau

Tag der mündlichen Prüfung: 04.02.2009

Die Neugier steht immer an erster Stelle eines Problems, das gelöst werden will.

Galileo Galilei

MEINEN ELTERN

Abstract

The ubiquitin-proteasome system (UPS) is the major intracellular system for protein degradation. It plays an important role in the regulation of cellular processes like cell cycle control, signal transduction and gene transcription. For correct functionality of the UPS a strong regulation of the proteasomal proteolytic activity is needed. In this regard the protein proteasome inhibitor 31 (PI31) was characterized as a potent inhibitor of proteasomal activity *in vitro*. Furthermore it was shown that PI31 modulates the assembly of the murine immunoproteasome (i20S) and its expression is induced by viral infections. The function and regulation of PI31 in the human system is so far unexplored and therefore the topic of this study.

With gene and transcript analysis it was shown that at least nine alternatively spliced variants of the PI31 gene *PSMF1* exist additionally to the PI31 transcript. The resulting PI31 isoforms V2 to V10 differ from PI31 (V1) in parts of the N-terminus or in a modified C-terminus. Only the isoform V5 is tissue specific expressed in testis and localized in the nucleus. In accordance to the murine system the localization of PI31 was shown at the endoplasmatic reticulum and cytosol of human cells.

From all isoforms including PI31 only the isoform V3 has the ability to inhibit the proteasomal activity *in vivo* after overexpression, which was clearly shown with activity assays in living cells and cell lysates. In contrast to the murine system neither PI31 nor the isoforms showed a modulatory effect on the assembly of the i20S. The overexpression of PI31 and V3 in human cells results instead in the accumulation and delayed degradation of proteasomal substrates. In case of V3 this accumulation is possibly the result of the proteasomal inhibition through V3. Together with data from a new published study, which show the heterodimerization of PI31 with the F-box protein Fbxo7, the presented results suggest a function of PI31 and its isoforms in the process of ubiquitination of proteasomal substrates. PI31 and V3 might affect the ubiquitination itself or the recognition of protein substrates through SCF^{Fbxo7} E3 ubiquitin ligases.

The mRNA of PI31 contains an over 3kb long 3' untranslated region (3'UTR), which is often a sign for regulation of gene expression at posttranscriptional levels. With reporter gene assays an inhibitory effect on the expression and therefore a regulatory role of the 3'UTR of PI31 was clearly shown. Furthermore the expression of human PI31 can be induced by virus associated stimuli like double stranded RNA (dsRNA) and type I interferones, whereas the induction through dsRNA is independent of the dsRNA receptor TLR3. However, the role of PI31 in the immune response must be analyzed further. The

presented results show, that the expression of PI31 is regulated both at transcriptional and translational level.

This study expands the knowledge about the function and regulation of the PI31 protein family by a new connection to the ubiquitin-proteasome system and the regulatory potential of the PI31-mRNA.

Zusammenfassung

Das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) eukaryotischer Zellen spielt eine zentrale Rolle beim proteolytischen Abbau von fehlgefalteten und nicht mehr benötigten Proteinen. Damit erfüllt es regulatorische Funktionen bei zellulären Prozessen, wie z. B. dem Zellzyklus, der Transkription und der Antigenprozessierung. Um die Funktionalität des UPS zu gewährleisten, muß die proteolytische Aktivität des Proteasoms streng reguliert werden. Das Protein Proteasominhibitor 31 (PI31) wurde in diesem Zusammenhang als potenter Inhibitor des Proteasoms *in vitro* charakterisiert. Des weiteren wurde gezeigt, daß überexprimiertes PI31 im murinen System eine modulatorische Wirkung auf die Assemblierung des Immunoproteasoms hat und die Expression von PI31 durch virale Infektionen induziert werden kann. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob PI31 im humanen System ebenfalls die Assemblierung des Immunoproteasoms beeinträchtigt und wie es sich mit der intrazellulären Lokalisierung von PI31 verhält. Außerdem wurde überprüft, inwieweit die Expression von humanem PI31 durch virale Stimuli induziert werden kann und ob die mRNA von PI31 eine regulatorische Funktion hat.

Durch Gen- und Transkriptstrukturanalysen konnte gezeigt werden, daß neben dem PI31-Transkript mindestens neun weitere PI31-ähnliche mRNA-Transkripte des humanen PI31 Gens *PSMF1* durch alternatives Spleißen generiert werden. Die resultierenden potentiellen PI31-Isoformen V2 bis V10 unterscheiden sich von PI31 (V1) teils durch eine fehlende N-terminale Domäne oder einen veränderten C-Terminus. Der auffälligste Unterschied besteht allerdings zwischen der Isoform V5 und PI31, da V5 als einzige Isoform eine gewebespezifische Expression in Testikeln und eine Kernlokalisierung aufweist. Dagegen konnte, in Übereinstimmung mit dem murinen System, PI31 am Endoplasmatischen Reticulum und im Cytosol humaner Zellen lokalisiert werden.

Von allen Isoformen einschließlich PI31 ist nur die PI31-Variante V3 in der Lage, die Aktivität des Proteasoms *in vivo* zu inhibieren, was eindeutig mit Aktivitätstests in Zelllysaten gezeigt werden konnte. Ein modulatorischer Einfluß von PI31 oder einer der Isoformen auf die Assemblierung des Immunoproteasoms bestätigte sich dagegen im humanen System nicht. Allerdings führte die Überexpression von PI31 und der Isoform V3 in humanen Zellen zu einer Akkumulation und teils verzögerten Degradation von endogenen proteasomalen Substraten. Im Falle von V3 läßt sich dieser Effekt möglicherweise auf die beobachtete Inhibition des Proteasoms zurückführen. In einer neu publizierten Studie wurde die Struktur des N-Terminus von PI31 aufgeklärt und eine Heterodimerisierung mit

dem F-Box Protein Fbxo7 gezeigt. In Ergänzung zu diesen Daten weisen die hier vorgestellten Ergebnisse auf eine Funktion von PI31 und dessen Isoformen bei der Ubiquitinierung von proteasomalen Substraten hin. PI31 und V3 beeinflussen dabei möglicherweise die Ubiquitinierung selbst oder die Erkennung von zu ubiquitinierenden Proteinen durch SCF^{Fbxo7} E3-Ubiquitinligasen.

Die mRNA von PI31 besitzt eine über 3kb lange 3' untranslatierte Region (3'UTR), was oft ein Hinweis auf eine posttranskriptionelle Regulation der Genexpression ist. In Reporterstudien wurde eindeutig nachgewiesen, daß die 3'UTR inhibitorisch auf die Expression wirkt und somit eine regulatorische Funktion besitzt. Es wurde außerdem gezeigt, daß die Expression von PI31 durch doppelsträngige RNA (dsRNA) und Typ I-Interferone induziert werden kann, und daß diese Induktion unabhängig vom dsRNA-erkennenden Rezeptor TLR3 vermittelt wird. Welche Rolle die Induktion von PI31 in der Immunabwehr spielt, muß allerdings noch geklärt werden. Die vorgestellten Ergebnisse zur Regulation von PI31 belegen, daß die Expression von PI31 sowohl auf Transkriptions- als auch auf Translationsebene reguliert werden kann.

In der vorliegenden Arbeit konnte das Wissen zur Funktion und Regulation der PI31-Proteinfamilie erweitert werden, indem ein neuer, bisher nicht bekannter Zusammenhang mit dem Ubiquitin-Proteasom-System und das regulatorische Potential der PI31-mRNA gezeigt wurden.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Ubiquitin-Proteasom-System	1
1.1.1	Assemblierung des 20S Komplexes	3
1.1.2	Regulatoren des 20S Proteasoms	3
1.1.3	Einfluß des Proteasoms auf die Antigenprozessierung	5
1.2	PI31	6
1.2.1	Das Protein PI31	6
1.2.2	Interaktionen von PI31	8
1.2.3	Regulation von PI31	9
1.3	Zielsetzung	11
2	Ergebnisse	12
2.1	Charakterisierung des humanen PI31-Gens und der Spleißvarianten	12
2.1.1	Das Gen <i>PSMF1</i> und seine Struktur	12
2.1.2	Spleißvarianten von <i>PSMF1</i>	13
2.1.3	Northernblot-Analyse	17
2.1.4	Stabilität der mRNA	18
2.2	Proteinbiochemische Charakterisierung	19
2.2.1	Struktureller Vergleich der Proteine V1 bis V5	20
2.2.2	Proteinbiochemische Analyse von PI31 und der Isoformen	21
2.3	Regulation von PI31	27
2.3.1	Einfluß von Typ I-Interferonen und dsRNA auf die Expression	27
2.3.2	Promotorstudien	29
2.4	Interaktionen und Funktion	34
2.4.1	Interaktionen von PI31	34
2.4.2	PI31 und das Immunoproteasom	37
2.4.3	Einfluß der Isoformen von PI31 auf das Proteasom	40
2.4.4	Wirkung auf <i>in vivo</i> Substrate des Proteasoms	41

2.4.5	Abbaukinetiken endogener Substrate nach V3-Transfektion	42
2.4.6	Analyse der artifiziellen Spleißvariante	46
3	Diskussion	50
3.1	Alternatives Spleißen des PI31-Gens <i>PSMF1</i>	50
3.2	Regulation von PI31	53
3.2.1	Induktion durch virusassoziierte Stimuli	53
3.2.2	Promotor, 5' und 3'UTR von <i>PSMF1</i>	54
3.3	Funktion von PI31 und der Isoform V3	57
3.3.1	Interaktionspartner	63
3.4	Ausblick	65
4	Anhang	67
5	Material und Methoden	72
5.1	Zellkultur	72
5.1.1	Zelllinien und Medien	72
5.1.2	Plasmid-Transfektion von HeLa-Zellen	73
5.1.3	Immunfluoreszenz	73
5.2	Molekularbiologische Methoden	74
5.2.1	Hybridisierung und Detektion der RNA-Sonden	75
5.2.2	Klonierung der verwendeten Plasmide	75
5.2.3	Generierung von doppelsträngigen DNA-Oligonukleotiden	77
5.3	Proteinbiochemische Methoden	81
5.3.1	Antikörpergenerierung und -reinigung	81
5.3.2	Zellyse und Proteinisolierung	82
5.3.3	Bestimmung der Proteinkonzentration	82
5.3.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	82
5.3.5	Western Blot und Immundetektion	83
5.3.6	Coomassiefärbung	85
5.3.7	Immunpräzipitation	85
5.3.8	Dichtegradientenzentrifugation	85
5.3.9	Extrahierung von Membranproteinen	86
5.3.10	Vernetzung intrazellulärer Proteine	86
5.4	Funktionelle Assays	86
5.4.1	Proteaseassay mit fluorogenen Peptidsubstraten	86
5.4.2	<i>Proteasome-Glo Cell Based Assay</i>	87
5.4.3	MTT-Assay	87

<i>INHALTSVERZEICHNIS</i>	ix
5.4.4 CAT-ELISA	87
5.5 Computergestützte Methoden	88
Abkürzungsverzeichnis	89
Literaturverzeichnis	91
Danksagung	104
Publikationsliste	105
Selbständigkeitserklärung	106

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Das Ubiquitin-Proteasom-System

Die Proteine einer Zelle werden kontinuierlich synthetisiert und wieder degradiert. Wichtig im Lebenszyklus der Zelle ist die korrekte Regulation der Synthese und des Abbaus, mit besonderem Hinblick auf die Degradation von fehlerhaften oder nicht funktionstüchtigen Proteinen, die u. a. durch Mutationen oder Schädigungen der Zelle auftreten können. Die Fehlregulation der degradierenden Systeme kann z. B. zu Krebs und neurodegenerativen Erkrankungen führen.

Die zellulären Proteine eukaryotischer Organismen werden im Laufe ihres Daseins hauptsächlich durch das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) abgebaut. Das UPS spielt dabei eine zentrale Rolle bei der Regulation grundlegender zellulärer Prozesse, wie der Zellzykluskontrolle, Transkription und Signaltransduktion, indem es z. B. kurzlebige Transkriptionsfaktoren oder Signalproteine degradiert. Des weiteren ist das UPS an der Generierung von Epitopen, die durch MHC¹-Klasse I Moleküle präsentiert werden, beteiligt.

Proteine, die für den Abbau vorgesehen sind, werden kovalent mit mehreren Kopien des hochkonservierten Proteins Ubiquitin markiert, woraufhin sie vom 26S Proteasom erkannt und ATP-abhängig degradiert werden (Hershko und Ciechanover, 1998). Die Ubiquitinierung von Substraten geschieht in drei Schritten über eine ATP-abhängige Enzymkaskade. Zuerst wird Ubiquitin (Ub) durch Bildung einer Thioester-Bindung mit einem Ubiquitin-aktivierenden Enzym (E1) aktiviert und daraufhin auf ein Ub-konjugierendes Enzym (E2) übertragen. Im letzten Schritt erfolgt eine Interaktion von E2 mit einer E3-Ubiquitinligase. E3-Ligasen stellen eine Proteinfamilie mit mehreren hundert Mitgliedern dar, die für die Substraterkennung und dessen darauffolgende Ubiquitinierung verantwort-

¹major histocompatibility complex

lich ist (Kornitzer und Ciechanover, 2000). Ein Ubiquitinmolekül wird dabei kovalent an die ϵ -Aminogruppe eines Lysinrestes des zu degradierenden Proteins gekoppelt. Diese Kaskade kann sich mit einem Substrat mehrmals wiederholen, wobei weitere Ubiquitinmoleküle an das erste Ubiquitin geheftet werden, so daß im Endeffekt eine Polyubiquitinkette entsteht. Die Degradation des so markierten Proteins erfolgt durch das katalytische Zentrum des 26S Proteasoms, dem 20S Kernkomplex.

Das 20S Proteasom besteht aus vier heptameren Ringen, die zusammen eine zylinderförmige, etwa 700kDa große Struktur bilden (Abbildung 1.1). In Eukaryoten setzen sich die beiden äußeren Ringe aus jeweils sieben verschiedenen α -Untereinheiten (α_1 – α_7) und die inneren Ringe aus sieben β -Untereinheiten (β_1 – β_7) zusammen (Groll et al., 1997). Von diesen besitzen nur die Untereinheiten β_1 , β_2 und β_5 proteolytische Aktivität, jedoch mit jeweils unterschiedlicher Spezifität. So unterscheidet man mit Hilfe von fluorogenen Peptidsubstraten zwischen der chymotrypsinähnlichen (β_5 ; Spaltung nach hydrophoben Resten), der trypsinähnlichen (β_2 ; Spaltung nach basischen Resten) sowie der caspaseähnlichen Aktivität (β_1 ; Spaltung nach sauren Resten) (Dick et al., 1998; Orłowski und Wilk, 2000).

In Vertebraten existieren neben diesen drei konstitutiven katalytischen Untereinheiten noch drei weitere β -Formen. Diese werden als Immununterheiten bezeichnet, da deren Expression u. a. durch Typ I und II-Interferone (IFN) induzierbar ist (Aki et al., 1994; Groettrup et al., 1996a; Shin et al., 2006). Die Immununterheiten sind katalytisch aktive Homologe von β_1 , β_2 und β_5 und entstanden durch Genduplikation. Nach einem proinflammatorischen Stimulus erfolgt in neu assemblierenden Proteasomen der Einbau von LMP2 ($i\beta_1$) statt β_1 , MECL1 ($i\beta_2$) statt β_2 und LMP7 ($i\beta_5$) statt β_5 , wodurch das sogenannte Immunoproteasom ($i20S$) entsteht (Abb. 1.1).

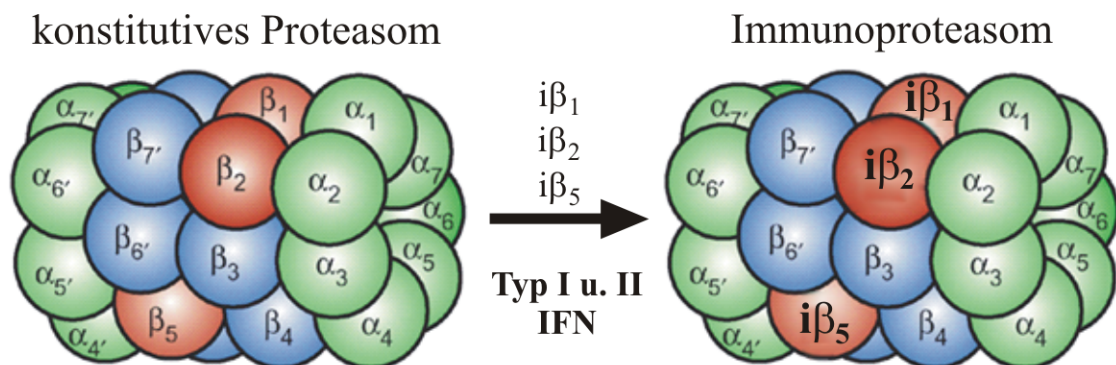


Abbildung 1.1: Das 20S Proteasom besteht aus insgesamt 28 Untereinheiten. Die beiden äußeren Ringe sind jeweils aus sieben verschiedenen α - und die inneren Ringe aus sieben β -Untereinheiten aufgebaut. Die katalytischen β -Untereinheiten (β_1 , β_2 und β_5) sind rot dargestellt. Diese werden nach einem proinflammatorischen Stimulus (z. B. Typ I u. II-Interferone) in neu assemblierenden Proteasomen durch die induzierbaren Untereinheiten $i\beta_1$, $i\beta_2$ und $i\beta_5$ ersetzt, wodurch das Immunoproteasom entsteht (nach Kloetzel, 2004).

1.1.1 Assemblierung des 20S Komplexes

Die koordinierte Zusammenführung von insgesamt 28 Untereinheiten zum funktionellen 20S Proteasom in Eukaryoten bedarf der Unterstützung verschiedener Chaperone. Bisher sind fünf dieser Helferproteine bekannt, die teils an unterschiedlichen Assemblierungsschritten des Proteasoms beteiligt sind.

Man geht davon aus, daß sich zuerst ein α -Ring mit Hilfe der Proteine PAC1 bis 4² bildet, wobei PAC1/2 und PAC3/4 als Heterodimere agieren (Hirano et al., 2005, 2006; Le Tallec et al., 2007). Während die PACs keine essentiellen Chaperone sind, und deren Fehlen nur zu einer verzögerten Assemblierung führt, ist ein weiteres Protein namens POMP³ unerlässlich für die 20S Assemblierung und die Vitalität der Zelle (Witt et al., 2000). POMP assoziiert ebenfalls mit dem α -Ring und ist für die Rekrutierung der β -Untereinheiten zu diesem verantwortlich (Heink et al., 2005; Fricke et al., 2007). Mit Ausnahme von β 3 und β 4 werden alle β -Untereinheiten als Proformen mit N-terminalen Prosequenzen exprimiert und erst im Laufe der Proteasomassemblierung durch Autokatalyse prozessiert (Schmidtke et al., 1996). Die Prosequenzen spielen eine essentielle Rolle bei der Assemblierung, wenngleich die genaue Funktion noch kontrovers diskutiert wird. Die Inkorporation der β -Untereinheiten in den Komplex geschieht schrittweise, wobei die entstehenden Assemblierungsintermediate als 13S und 16S Vorläufer bezeichnet werden. Die Dimerisierung zweier 16S Intermediate und die Prozessierung der Prosequenzen stellt den letzten Schritt der Reifung zum 20S Proteasom dar (Frentzel et al., 1994).

Die Assemblierung des Immunoproteasoms verläuft ähnlich, allerdings unterscheidet sich u. a. die Reihenfolge der Inkorporation der β -Untereinheiten von der des konstitutiven Proteasoms (Nandi et al., 1997). Heink et al. konnten zudem zeigen, daß die Reifung des i20S Proteasoms schneller vonstatten geht, und es außerdem eine kürzere Halbwertszeit als das 20S Proteasom besitzt (Heink et al., 2005).

1.1.2 Regulatoren des 20S Proteasoms

Der 19S Regulator (PA700)

Das 26S Proteasom setzt sich aus dem 20S Kernkomplex und einem oder zwei 19S Regulatoren (Proteasomaktivator PA700) zusammen (Hoffman et al., 1992). Der 19S Regulator ist verantwortlich für die Erkennung von polyubiquitinierten Proteinen, deren Deubiquitinierung, Entfaltung und anschließender Translokation in den 20S Kernkomplex. Der 19S Regulator besteht aus ca. 18 verschiedenen Untereinheiten und kann in zwei Subkomplexe

²proteasome assembly chaperone

³proteasome maturation protein

unterteilt werden, den *Base* und den *Lid* (Abb. 1.2) (Glickman und Ciechanover, 2002). In Eukaryoten beinhaltet der *Base* Subkomplex sechs verschiedene, ringförmig angeordnete AAA-ATPasen⁴, die ATP-abhängig direkt mit einem α -Ring des 20S Proteasoms interagieren. Die Interaktion wird durch die C-Termini von zwei dieser ATPasen vermittelt und führt zur Konformationsänderung und damit Öffnung des α -Rings (Groll et al., 2000; Smith et al., 2007). Es wurde gezeigt, daß der *Base* Subkomplex eine chaperonähnliche Aktivität besitzt und somit die Entfaltung von Substraten sowie deren Überführung in das 20S ermöglicht (Braun et al., 1999). Zwei zusätzliche Nicht-ATPasen-Untereinheiten des *Base* bilden die Verbindung zum *Lid*, der u. a. für die Erkennung von Polyubiquitinkonjugaten sowie die Deubiquitinierung des Substrates verantwortlich ist (Glickman und Ciechanover, 2002).

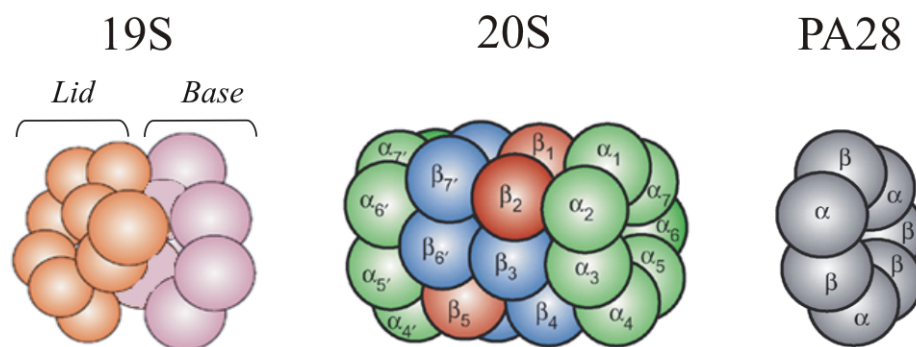


Abbildung 1.2: Aufbau des 20S Proteasoms und der Regulatoren 19S und PA28. Der 19S Komplex wird in die Subkomplexe *Lid* und *Base* unterteilt und kann ebenso wie PA28 an die α -Ringe des 20S binden. Das 20S zusammen mit zwei 19S Regulatoren bildet das 26S Proteasom. Bindet jeweils ein 19S und ein PA28 Komplex an das 20S, entsteht ein Hybridproteasom (nach Kloetzel, 2001).

PA28 (11S-Regulator)

Der Proteasomaktivator PA28 ist ein ringförmiger heptamerer Komplex aus zwei verschiedenen, etwa 28kDa großen α - und β -Untereinheiten (Abb. 1.2). Die Untereinheiten PA28 α und PA28 β sind hoch homolog und ihre Expression ist wie die der Immununtereinheiten des Proteasoms durch Typ I und II-Interferone induzierbar (Realini et al., 1994; Shin et al., 2007). Er interagiert ATP-unabhängig mit den α -Ringen des 20S Proteasoms und bewirkt ebenfalls eine Konformationsänderung und Öffnung der α -Ringe (Rechsteiner und Hill, 2005). Im Gegensatz zum 19S Regulator ist PA28 $\alpha\beta$ nicht in der Lage, ubiquitinierte Proteine zu binden und zu entfalten. Es stimuliert dagegen die Degradation von kleinen Peptiden und kann die proteolytischen Eigenschaften des Proteasoms sowie dessen Substratumsatz verändern (Dick et al., 1996; Groettrup et al., 1996b; Stohwasser et al., 2000).

⁴ ATPasen-assoziert-mit-verschiedenen-zellulären-Aktivitäten

1.1.3 Einfluß des Proteasoms auf die Antigenprozessierung

Der Großteil, der als Antigene über MHC-Klasse I präsentierten Peptide, wird durch die Degradation von intrazellulären Proteinen durch das UPS generiert. Das Immunoproteasom hat dabei eine wichtige Funktion bei der Prozessierung von Epitopen, da die Immununtereinheiten eine andere Schnittpräferenz aufweisen als ihre konstitutiven Homologe. Die induzierbaren β -Untereinheiten schneiden bevorzugt nach hydrophoben und basischen Aminosäureresten und weniger effizient nach sauren (Aki et al., 1994; Boes et al., 1994). Die entstehenden Peptide besitzen so eine hydrophobe oder basische Aminosäure an erster Stelle ihres C-Terminus und werden dadurch vom TAP-Transporter⁵ und von MHC-Molekülen bevorzugt gebunden (van Endert et al., 1995). Die Peptide werden vom TAP-Transporter in das ER transportiert und nach Bindung an MHC-Moleküle, über den ER/Golgi-Sekretionsweg an der Zelloberfläche präsentiert.

Es wurde gezeigt, daß neben dem Immunoproteasom auch PA28 eine verbesserte Generierung von Epitopen bewirkt, die u. a. vermutlich auf Konformationsänderungen im 20S Kernkomplex durch die Bindung von PA28 beruht (Li et al., 2001). Durch die Expression von PA28 nach IFN γ -Stimulation konnte zusätzlich ein vermehrtes Auftreten von Hybridproteasomen (19S-20S-PA28) festgestellt werden (Tanahashi et al., 2000). Es wird angenommen, daß deren Formierung ebenfalls mit einer besseren Antigenprozessierung im Zusammenhang steht (Kloetzel, 2004; Rechsteiner und Hill, 2005).

Das UPS in der viralen Infektion

Virusinfektionen haben die rasche Induktion von zahlreichen Genen zur Folge und bedeuten außerdem einen massiven Eingriff in das zelluläre Gleichgewicht von Proteinsynthese und -degradation.

Für die Erkennung einer viralen Infektion sind verschiedene *pattern-recognition receptors* verantwortlich, wie z. B. Mitglieder der TLR⁶-Familie (TLR3, 4, 7, 8 und 9), die RNA-Helikasen RIG-I⁷ und Mda-5⁸ sowie die IFN-induzierbaren Proteine PKR⁹ und OAS¹⁰ (Lee und Kim, 2007). Die Erkennung von pathogenassoziierten Molekülen, wie z. B. virale doppelsträngige RNA (dsRNA) durch TLR3, löst Signalkaskaden aus, die zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren *nuclear factor* (NF)- κ B, *activator protein*-1 sowie einigen *interferone regulatory factors* führen. Diese leiten die Expression von antiviral wirksamen Genen

⁵Transporter, assoziiert mit der Antigenprozessierung

⁶*Toll-like receptor*

⁷*retinoic acid inducible gene 1*

⁸*melanoma differentiation-associated gene 5*

⁹*double-stranded RNA-activated protein kinase*

¹⁰*2',5'-oligoadenylate synthetase*

ein, zu denen Typ I-Interferone ($\text{IFN}\alpha$ u. β) zählen (Lee und Kim, 2007). Typ I-Interferone induzieren daraufhin über den JAK/STAT¹¹-Signalweg die Expression von weiteren immunrelevanten Genen, u. a. das Typ II-Interferon $\text{IFN}\gamma$, die proteasomalen Immununtereinheiten, PA28 u. v. a. (Platanias, 2005).

Viren haben etliche Strategien entwickelt, das UPS zu manipulieren und der Immunantwort zu entkommen (Gao und Luo, 2006). Viele Viren benutzen eigene E3-Ubiquitinligasen, um in der Immunabwehr tätige, zelluläre Proteine zu ubiquitinieren und der Degradation preiszugeben. Das Genom des Herpesvirus HHV-8 kodiert z. B. für zwei E3-Ligasen (K3 u. K5), die für die Ubiquitinierung von MHC-Klasse I Molekülen verantwortlich sind, die daraufhin endocytiert und lysosomal abgebaut werden (Coscoy et al., 2001). Eine andere Vorgehensweise, um der Immunantwort zu entkommen, nutzt das Epstein-Barr-Virus (EBV), indem die Prozessierung von viralen Antigenen durch das UPS mittels des EBV-Proteins EBNA1 inhibiert wird (Levitskaya et al., 1997). Ein weiterer Mechanismus ist der Eingriff von Viren in Interferonsignalwege, indem z. B. Proteine des Mumps- und Simian-Virus die Degradation des Transkriptionsfaktors STAT durch das Proteasom stimulieren und somit einen antiviralen Signalweg unterbrechen (Gotoh et al., 2002).

1.2 PI31

1.2.1 Das Protein PI31

Aufgrund der Bedeutung von regulatorischen Proteinen für die korrekte Funktion des Proteasoms wurde von der Gruppe um DeMartino 1992 eine Suche nach Proteinen durchgeführt, die die Aktivität des Proteasoms beeinflussen und verändern können. In diesem Zusammenhang identifizierten sie ein Protein, das *in vitro* einen inhibitorischen Einfluß speziell auf die Aktivität des Proteasoms zeigte, hingegen andere Proteasen nicht beeinträchtigte. Dieses Protein wurde als Proteasominhibitor mit einem Molekulargewicht von 31kDa (PI31) bezeichnet. Es konnte gezeigt werden, daß PI31 *in vitro* in der Lage ist, alle drei katalytischen Aktivitäten des Proteasoms zu inhibieren, was mit synthetischen Peptiden sowie dem Proteinsubstrat Casein belegt wurde (Ma et al., 1992). Die mit fluorogenen Peptidsubstraten gemessene chymotrypsin- und caspaseähnliche Aktivität kann dabei durch steigende Konzentrationen von PI31 fast vollständig inhibiert werden, wohingegen die trypsinähnliche Aktivität des Proteasoms nur bis zu maximal 50% beeinträchtigt wird. Der Austausch der katalytischen β -Untereinheiten des Proteasoms gegen die interferon-induzierten Immununtereinheiten hat dabei keinen Einfluß auf die Inhibitorfunktion von

¹¹Janus activated kinase/signal transducer and activator of transcription

PI31, da die Aktivität des Immunoproteasoms in gleicher Weise wie die des konstitutiven Proteasoms beeinträchtigt wird (Zaiß et al., 1999).

In der denaturierenden Gelelektrophorese zeigt PI31 ein Molekulargewicht von etwa 30kDa, migriert jedoch im Nativgel mit einer Größe von ca. 60kDa. Das legte die Vermutung nahe, daß PI31 Homodimere bilden kann (Ma et al., 1992). Untersuchungen der hydrodynamischen Eigenschaften des Proteins durch Sedimentationsgleichgewicht-Zentrifugation ließen auf ein Gleichgewicht zwischen Monomer und Dimer schließen, wobei die Dissoziationskonstante von $6,25\mu\text{M}$ eher für einen monomeren Zustand in der Zelle sprach (McCutchen-Maloney et al., 2000).

Durch Klonierung der cDNA des humanen PI31 und der daraus resultierenden Aminosäuresequenz von 271AS wurde PI31 als ein bisher unbekanntes Protein mit einem hohen Prolinanteil (13%) identifiziert, wobei der Großteil der Prolinreste sich im C-Terminus konzentriert. Mittels Circular dichroismus konnte eine hauptsächlich alpha-helikale Struktur des N-Terminus nachgewiesen werden, wohingegen der C-Terminus aufgrund der vielen Prolinreste eine undifferenzierte Struktur aufweist. Die inhibitorisch wirksame Domäne von PI31 wurde durch Mutationsstudien von McCutchen-Maloney et al. (2000) auf die letzten 80AS des C-Terminus eingeschränkt. Weitere Studien konnten die Anzahl der inhibitorisch wirksamen Reste auf die letzten 60AS reduzieren (U. Kuckelkorn, pers. Komm.).

PI31 assoziiert mit dem 20S Proteasom *in vitro*, wodurch es zur Inhibition kommt. Es stellt allerdings kein Substrat des Proteasoms dar, was zur Schlußfolgerung führte, daß der inhibitorische Effekt nicht auf einen Wettbewerb von PI31 mit Proteasomsubstraten zurückzuführen ist (McCutchen-Maloney et al., 2000). Zaiß et al. konnten zeigen, daß das Protein mit dem Proteasomaktivator PA28 um die Bindung am 20S Proteasom kompetiert und die Affinität von PI31 zum Proteasom um den Faktor 50 höher ist als die von PA28 (Zaiß et al., 1999). Diese hohe Affinität scheint der Grund zu sein, weshalb auch die Aktivierung des Proteasoms durch den 19S Regulatorkomplex (PA700) durch PI31 inhibiert wird (McCutchen-Maloney et al., 2000).

Im Jahre 2002 folgten Studien in murinen MEC217- und B8-Zellen zur Funktion von PI31 (Zaiß et al., 2002). Überraschenderweise konnte keine Inhibition der Aktivität zellulärer 20S und 26S Proteasomen durch die Überexpression von PI31 festgestellt werden. Stattdessen wurde gezeigt, daß das überexprimierte Protein die Reifung von Immunoproteasomen beeinträchtigt. Zaiß et al. beobachteten eine Akkumulation der 16S Immunoproteasomvorläufer, die noch unprozessierte Immununtereinheiten enthielten. Sie schlußfolgerten daraus, daß PI31 zwar die Formierung von 16S Intermediaten erlaubt aber die vollständige Reifung zum 20S Proteasom verzögert. Diese Beeinträchtigung scheint ein spezifischer Effekt auf das Immunoproteasom zu sein, da die Assemblierung des konstitutiven Proteasoms nicht betroffen ist (Zaiß et al., 2002).

Zusätzlich konnte gezeigt werden, daß in PI31 überexprimierenden Zellen, die mit IFN γ stimuliert wurden, die MHC-Klasse I Präsentation des i20S-abhängigen CTL-Epitops E1B reduziert war. Wohingegen das Epitop E1A, das durch das gleiche MHC-Klasse I Molekül präsentiert aber i20S-unabhängig generiert wird, unbeeinträchtigt blieb. Diese Ergebnisse untermauern die mögliche Funktion von PI31 als ein Modulator des i20S Proteasoms, der dessen Reifung behindert und es somit zu einer verringerten Epitopgenerierung und -präsentierung kommt (Zaiß et al., 2002).

Zaiß et al. bestimmten außerdem mittels Immunfluoreszenzaufnahmen, daß PI31 in murinen Zellen hauptsächlich cytosolisch am ER lokalisiert.

1.2.2 Interaktionen von PI31

Neben dem 20S Proteasom als Interaktionspartner *in vitro*, waren bisher keine Proteine bekannt, die mit PI31 *in vivo* wechselwirken. Allerdings wurden Sequenzmotive im prolinreichen C-Terminus von PI31 identifiziert, die von der GYF¹²-Domäne des Proteins CD2BP2¹³ *in vitro* mit hoher Affinität erkannt werden (Kofler et al., 2005a). Die Interaktion mit CD2BP2 wurde jedoch nur mit dem isolierten prolinreichen C-Terminus von PI31 in einem *yeast two-hybrid* Interaktionssystem gezeigt.

CD2BP2 wurde ursprünglich bei der Suche nach Interaktionspartnern von CD2¹⁴ in einem *yeast two-hybrid* System identifiziert. Es interagiert mit dem prolinreichen cytoplasmatischen Teil von CD2 über eine bisher unbekannte prolinbindende Domäne (GYF-Domäne). Durch Überexpression der GYF-Domäne in Jurkat-Zellen konnte gezeigt werden, daß deren Interaktion mit CD2 den Signalweg zur Produktion von Interleukin-2 stimuliert (Nishizawa et al., 1998). In späteren Arbeiten wurde jedoch festgestellt, daß CD2BP2 hauptsächlich im Kern lokalisiert, wohingegen CD2 ein zellmembranständiges Protein ist (Kofler et al., 2004; Heinze et al., 2007). Diese Diskrepanz scheint auch mit der Grund für die Beobachtung zu sein, daß der CD2-Signalweg in T-Zellen unabhängig von CD2BP2 verläuft (Heinze et al., 2007).

In Zusammenhang mit der Kernlokalisierung wurde aber eine Interaktion von CD2BP2 mit prolinreichen Proteinen des Spleißosoms festgestellt (Kofler et al., 2004). Kurz darauf identifizierten Laggerbauer et al. CD2BP2 als transienten Bestandteil eines Subkomplexes des Spleißosoms und diskutierten eine mögliche Rolle bei dessen Assemblierung. Dabei stellten sie überraschenderweise fest, daß die GYF-Domäne von CD2BP2 auch eine prolinunabhängige Interaktion vermitteln kann (Laggerbauer et al., 2005). Die Relevanz der be-

¹²Glycin [G], Tyrosin [Y], Phenylalanin [F]

¹³CD2 bindendes Protein 2

¹⁴*cluster of differentiation 2*

obachteten *in vitro*-Interaktion von PI31 mit der GYF-Domäne von CD2BP2 ist allerdings aufgrund der unterschiedlichen intrazellulären Lokalisierung beider Proteine unklar und wurde bisher noch nicht untersucht.

GYF-Domänen sind Adapterdomänen, die prolinreiche Sequenzen mit dem Grundmotiv [PPG] binden können und in Proteinen von fast allen eukaryotischen Organismen zu finden sind (Kofler und Freund, 2006). Im humanen System sind nur zwei weitere, bisher uncharakterisierte Proteine mit einer GYF-Domäne bekannt, PERQ-1 und PERQ-2¹⁵. Deren Maushomologe GIGYF-1 und 2¹⁶ interagieren mit dem Grb10-Adapterprotein, das u. a. an der Regulation des Insulinrezeptors beteiligt ist. Grb10 und die GIGYF-Proteine agieren in diesem Zusammenhang möglicherweise kooperativ (Giovannone et al., 2003). Im Gegensatz zur GYF-Domäne von CD2BP2 konnte für die Domänen von PERQ-1 und PERQ-2 jedoch keine Interaktion mit PI31 festgestellt werden (Kofler et al., 2005b).

Zum Ende dieser Arbeit erschien eine Studie, die einen strukturellen Zusammenhang zwischen PI31 und dem F-Box Protein Fbxo7 zeigt (Kirk et al., 2008). Beide Proteine besitzen eine konservierte Dimerisierungsdomäne, die sowohl eine Homo- als auch Heterodimerisierung von PI31 und Fbxo7 erlaubt. F-Box Proteine sind Komponenten von SCF (Skp1, Cullin1, F-Box) E3-Ubiquitinligasen und verantwortlich für die Substraterkennung (Ho et al., 2006). Die mögliche Funktion von PI31 bei diesem Prozeß ist allerdings noch unklar.

1.2.3 Regulation von PI31

Die Klonierung und Sequenzierung der cDNA von humanem PI31 ergab, daß diese eine außergewöhnlich lange untranslatierte 3'-Region (3'UTR) von ca. 2,1kb aufwies, was auf eine mögliche regulatorische Funktion hindeutet aber nicht weiter untersucht wurde (McCutchen-Maloney et al., 2000). Die Expression und Regulation von PI31 wurde bisher nur im murinen System analysiert (Zaiß, 2000). PI31 wird in allen untersuchten Geweben relativ gleichmäßig exprimiert, sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene. Ebenso konnte in verschiedenen murinen Zelllinien eine gleichmäßige Expression festgestellt werden (Zaiß, 2000).

Es wurden außerdem verschiedenste Stimuli wie Hitzeschock, Cytokine etc. auf ihr Potential hin überprüft, die Expression von PI31 in diversen Zelllinien zu beeinflussen. In allen getesteten Fällen kam es zu keiner Veränderung der Expression. Lediglich die Infektion von MEC217-Zellen mit Adenovirus Typ 5 führte zu einer Erhöhung der mRNA- und Proteinmenge von PI31 (Zaiß, 2000). Es wurde vermutet, daß Adenovirus Typ 5 PI31 da-

¹⁵Prolin [P], Glutamat [E], Arginin [R], Glutamin [Q]-reiches Protein mit GYF-Domäne -1 bzw. -2

¹⁶Grb10 interagierendes GYF-Protein 1 bzw. 2

zu benutzt, der Immunantwort zu entkommen, indem es die Reifung des 20S Proteasoms behindert und so die Präsentation viraler Epitope reduziert (siehe Abschnitt 1.2.1).

Daß die Expression von PI31 durch Virusinfektionen stimuliert werden kann, zeigten auch die *Real Time*-PCR Ergebnisse von Shin et al. (nicht veröffentlichte Daten). So wurde bei HCV¹⁷-infizierten Schimpansen etwa ab der zweiten Woche bis zur sechsten Woche nach Infektion, ein ca. zweifacher Anstieg der PI31-mRNA Menge in Leberbiopsien verzeichnet. Dieser Anstieg entsprach in etwa den gemessenen Werten für PA28 und MECL1 (Shin et al., 2006). Eine Induktion von PI31 war ebenfalls in Mäusen, die mit Coxsackieviren infiziert wurden, zu beobachten. Die Auswertung von Microarray-Daten zeigte einen etwa 1,8 fachen Anstieg der PI31-mRNA Menge nach 8 Tagen Infektion (U. Kuckelkorn, nicht veröffentlichte Daten).

Im Rahmen der Suche nach neuen Gen-Methylierungs- und Expressionsmarkern bei Brustkrebs wurde vor kurzem das PI31-Gen *PSMF1* als ein Kandidat identifiziert, der eine abnormale Methylierung seiner CpG-Insel sowie eine stark verringerte Expression in Brustkrebsgewebe aufwies (Kuznetsova et al., 2007). Als CpG-Inseln werden genomische Sequenzen mit einem hohen Anteil an Cytosin (C) und Guanin (G), die häufig als Dinukleotide (CpG) auftreten, bezeichnet. Meist sind CpG-Inseln im Promotor von *housekeeping*-Genen in der Nähe des Transkriptionsstarts lokalisiert und liegen i. d. R. unmethyliert vor. Die CpG-Methylierung ist ein epigenetischer Mechanismus zur Regulation der Genexpression, wobei durch diese Modifizierung die Expression verhindert wird. Es wurde festgestellt, daß in Tumorgewebe vermehrt eine abnormale Methylierung von Promotoren wie z. B. von Tumorsuppressorgenen auftritt, die in gesundem Gewebe nicht methyliert sind. Das Methylierungs- und damit zusammenhängende Expressionsmuster von Genen wird deshalb immer häufiger als Detektionsmarker für Krebs genutzt (Esteller, 2007).

Aufgrund der Beobachtungen von Kuznetsova et al. (2007) besteht die Möglichkeit, daß eine verminderte Expression von PI31 evtl. in Zusammenhang mit der Karzinogenese steht.

¹⁷Hepatitis-C-Virus

1.3 Zielsetzung

PI31 wurde ursprünglich als Inhibitor des Proteasoms identifiziert. Die verfügbaren Informationen zu den Eigenschaften von PI31 rühren größtenteils von *in vitro* Versuchen mit gereinigten Proteinen her, deren Ergebnisse sich aber nicht ohne weiteres auf die tatsächliche *in vivo* Situation übertragen lassen. Die zelluläre Funktion von PI31 als spezifischer Modulator des Immunoproteasoms wurde in Zusammenhang mit der Induzierbarkeit durch Virusinfektionen gebracht und bisher nur im murinen System gezeigt. Über die Eigenschaften und Funktion des humanen PI31 im zellulären Kontext sowie dessen Regulation auf RNA- und Proteinebene ist hingegen bisher noch nichts bekannt. Es sollten daher im Rahmen dieser Arbeit folgende Fragestellungen mit zellbiologischen Methoden untersucht werden:

1. Gibt es einen Einfluß viraler Stimuli auf die mRNA- bzw. Proteinexpression von PI31 im humanen System?
2. Welche molekularbiologischen Eigenschaften hat die mRNA von PI31, z. B. wie stabil ist sie und welche regulatorische Möglichkeiten besitzt die 3' untranslatierte Region?
3. Wie verhält es sich mit der intrazellulären Lokalisierung von PI31 im humanen System und besteht wie im murinen System ein Einfluß auf die Reifung des Immunoproteasoms?
4. Interagiert PI31 *in vivo* mit dem Proteasom sowie evtl. mit CD2BP2 und können mittels Koimmunpräzipitation und Massenspektrometrie neue Interaktionspartner identifiziert werden?

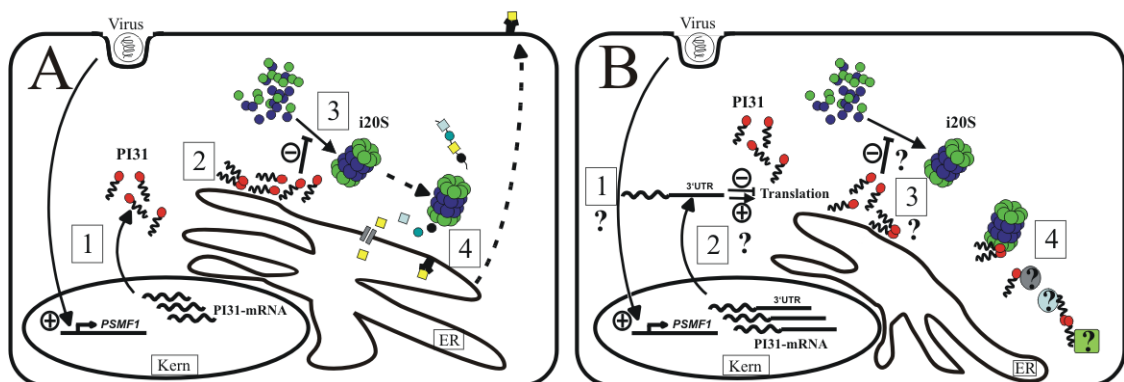


Abbildung 1.3: Übersicht der bekannten Eigenschaften bzw. Funktion von PI31 im murinen System sowie die Ziele dieser Arbeit. **(A)** Die Expression von PI31 wird durch Virusinfektionen auf RNA- und Proteinebene induziert [1]. PI31 lokalisiert am Endoplasmatischen Retikulum (ER) und ist in der Lage, Homodimere zu bilden [2]. Die Überexpression von PI31 führt zu einer verzögerten Reifung des Immunoproteasoms [3], was eine verminderte Antigenpräsentation viraler Epitope zur Folge hat [4]. **(B)** Wird PI31 im humanen System ebenfalls durch Virusinfektionen induziert [1]? Welche Besonderheiten hat die mRNA von PI31 und besitzt die 3'UTR eine regulatorische Funktion [2]? Lokalisiert PI31 im humanen System am ER und beeinflusst es ebenfalls die Assemblierung des Immunoproteasoms [3]? Gibt es eine Interaktion von PI31 mit dem Proteasom *in vivo* und können neue Interaktionspartner identifiziert werden [4]?

Kapitel 2

Ergebnisse

2.1 Charakterisierung des humanen PI31-Gens und der Spleißvarianten

2.1.1 Das Gen *PSMF1* und seine Struktur

Das humane PI31-Gen, *PSMF1*, ist auf Chromosom 20 an Position 20p13 lokalisiert. Laut der Datenbank AceView (Version Apr07) hat es eine Länge von 95,05kb (Basenpaar 1041877 bis 1136923) und ist auf dem Plus-Strang kodiert. Innerhalb von *PSMF1* sind zwei weitere Gene enthalten, eins kodiert für das Aktin Gamma Pseudogen 3 (Gen *ACTGP3*; bp 1089182 bis 1090679) auf dem Plus-Strang und eins für ein hypothetisches Protein (Gen *C20orf46*; bp 1114077 bis 1108937) auf dem Minus-Strang. Die für PI31 kodierende prä-mRNA setzt sich aus sieben Exons und sechs Introns zusammen und hat eine Länge von 48,3 bis 49,3kb (Abbildung 2.1). Die untranslatierte 5'-Region (5'UTR) ist ca. 180bp lang, wohingegen die 3'UTR eine Länge von rund 2250 bis 3350bp aufweisen kann, was auf eine regulatorische Funktion hindeutet.

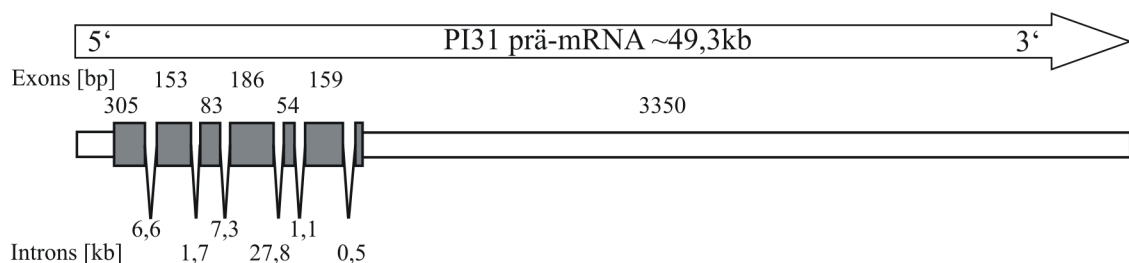


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Exon/Intronstruktur der prä-mRNA von PI31. Die Länge der Exons ist proportional zueinander dargestellt, die der Introns nicht. Die kodierende Region ist grau schattiert und die 5'UTR bzw. 3'UTR weiß.

Es wurde zusätzlich das PI31-Gen der Maus (*Psmf1*) mit dem humanen verglichen. Das murine *Psmf1* ist auf Chromosom 2 an Position 2 G3 lokalisiert und hat eine Größe von etwa 28,36kb. Es ist auf dem Minus-Strang kodiert, wobei jedoch der genomische Kontext, also die Gene in der Nachbarschaft von *Psmf1*, mit einigen Ausnahmen dem des humanen *PSMF1* ähnelt. Die hier gezeigte prä-mRNA-Struktur von humanem PI31 gleicht der der murinen hinsichtlich der Exonlängen. Die Unterschiede zwischen den Genen beider Spezies sind dagegen in der Länge der Introns zu finden, die im humanen Genom teilweise deutlich länger (>20.000bp) sind. Die kodierenden Regionen beider Spezies sind auf DNA-Ebene zu 86% homolog. Auffällig ist hingegen, daß die Sequenzen der jeweiligen 3'UTR nur zu 60% und die der 5'UTR zu 22% homolog sind. Möglicherweise ist die Regulation von PI31 auf RNA-Ebene durch diese relativ großen Unterschiede, auch in Bezug auf die Intronlänge, in Mensch und Maus verschieden.

2.1.2 Spleißvarianten von *PSMF1*

Durch Datenbankrecherche bei NCBI ging hervor, daß die prä-mRNA des Gens von PI31 (*PSMF1*) alternativ gespleißt werden kann. So gibt es neben der von McCutchen-Maloney et al. (2000) ursprünglich publizierten cDNA-Sequenz von PI31 (Referenznr. NM_006814) drei weitere PI31-ähnliche Sequenzeinträge (NM_178578, NM_178579, BC029836). NM_178578 kodiert ebenfalls für PI31 und unterscheidet sich nur in der 5'UTR, wohingegen NM_178579 und BC029836 aufgrund veränderter Exonzusammensetzung für Proteinvarianten von PI31 kodieren. Um die Bedeutung dieser beiden letzteren Spleißvarianten auch in Hinblick auf die Funktion und Regulation von PI31 näher zu untersuchen, sollten sie mittels RT-PCR amplifiziert und anschließend in Expressionsvektoren kloniert werden. Außerdem wurde die Klonierung der cDNA von PI31 in voller Länge angestrebt, da sich aus Datenbankeinträgen ergab, daß die 3'UTR um ca. 1000bp länger sein kann als von McCutchen-Maloney et al. (2000) publiziert. Möglicherweise beinhaltet diese verlängerte Form weitere regulatorische Elemente.

Für die Amplifizierung der Varianten wurden spezifische Primer anhand der entsprechenden cDNA-Sequenzen entworfen. Im Laufe der Versuche wurden weitere, bis dahin unbekannte Spleißvarianten identifiziert, deren Entdeckung im Folgenden dargelegt wird. Eine Übersicht der zehn beschriebenen Transkripte von *PSMF1* ist in Abbildung 2.2 dargestellt.

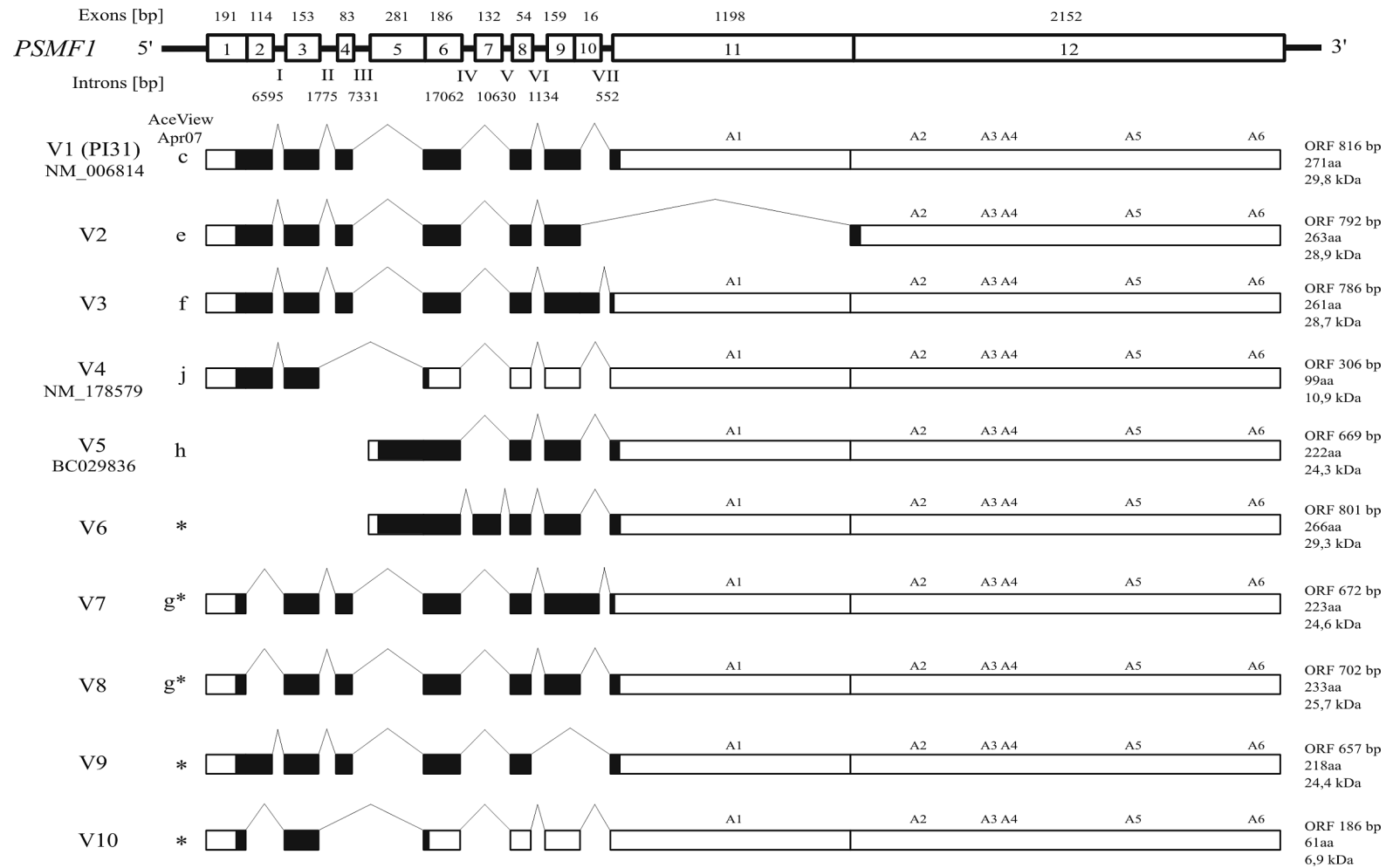


Abbildung 2.2: Darstellung der Genstruktur von *PSMF1* und der Exonzusammensetzung der Spleißvarianten mit Daten zu den potentiell entstehenden Proteinen. Die kodierenden Regionen sind schwarz, die UTRs weiß, A1–A6 sind die potentiellen poly(A)-Signale. Bei V1, V4 und V5 wurde die NCBI Referenznummer angegeben, außerdem erfolgte die Zuordnung der Varianten zu den Transkripten der AceView Datenbank ([*] = „nicht beschrieben“, [g*] = „unvollständig“).

Die Isoform von PI31 mit der Referenznummer NM_178579 (Variante 4) konnte mittels RT-PCR aus HeLa-RNA vervielfältigt und kloniert werden. Die Amplifizierung der Variante BC029836 (V5) aus verschiedenen Zelllinien (HeLa, T2, SKNEB, LN18, DU145, Tera-1) erwies sich als problematisch, was entweder auf ein sehr geringes Expressionsniveau oder eine Gewebespezifität hindeutete. Es konnte zwar in einer RT-PCR mit RNA der Zelllinie DU145 eine extrem schwache Bande detektiert werden (Abbildung 2.3), jedoch war die Menge für eine anschließende Klonierung zu gering. Die Wiederholung des Versuchs mit unterschiedlichen PCR-Bedingungen erbrachte kein besseres Ergebnis. Aufgrund der interessanten Exonzusammensetzung von V5 (siehe Abb. 2.2) wurde ein cDNA-Klon von BC029836 für die weitere Charakterisierung käuflich erworben. Als Positivkontrolle in den PCR-Versuchen, um V5 zu detektieren, wurde das Referenztranskript V1 (Primer 3F/3R) genutzt, wobei in der RT-PCR mit DU145-RNA unter dem Hauptsignal von V1 ein um etwa 100bp kleineres PCR-Produkt auftrat (Abbildung 2.3). Die Sequenzierung des zusätzlichen Produktes ergab interessanterweise drei weitere bisher unbekannte Spleißvarianten (V8, V9 und V10), die sich in ihrer Exonzusammensetzung deutlich von PI31 (V1) unterschieden.

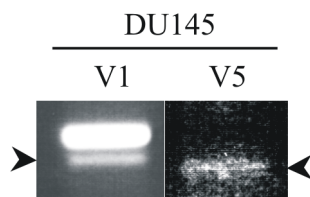


Abbildung 2.3: RT-PCR gegen V1 und V5 mit RNA aus DU145 Zellen. Der Pfeil beim V1-Ansatz markiert das zusätzlich amplifizierte kleinere PCR-Produkt, das für die Varianten V8, V9 u. V10 kodiert. Im V5-Ansatz wurde das schwache Signal von V5 verstärkt dargestellt und mit einem Pfeil markiert.

Weiterhin wurde angestrebt, die kodierende Region von PI31 zusammen mit unterschiedlich langen 3'UTR-Abschnitten mit Hilfe entsprechend erstellter Primer zu vervielfältigen. Dieses Vorhaben erwies sich jedoch als schwierig. Auch mit unterschiedlichen PCR-Bedingungen gelang es nicht, die cDNA von PI31 mit kompletter 3'UTR (insgesamt ~4100bp) oder die um 1000bp kürzeren Form wie von McCutchen-Maloney et al. (2000) publiziert, aus Kulturzellen zu amplifizieren. Es wurden nur maximal 2000bp lange PCR-Produkte detektiert sowie weitere Produkte, die von der vorher berechneten Größe abwichen. Aufgrund der Sequenzanalyse der amplifizierten Produkte sowie der nicht detektierbaren Menge von langen Fragmenten läßt sich vermuten, daß die mRNA von PI31 in HeLa-Zellen hauptsächlich mit einer kurzen 3'UTR (400–1400bp) vorliegt. Weiterhin stellte sich heraus, daß es sich bei den PCR-Produkten mit abweichender Größe um die bis dahin unbekannten Spleißprodukte V2 und V3 handelte (Abbildung 2.4). V2 unterschied sich mit den fehlenden 1200bp (Exon 11) am stärksten vom ursprünglichen PI31 (V1)-Transkript, wohingegen V3 mit dem zusätzlichen Exon 10 lediglich 16bp mehr aufwies als V1 (siehe Transkriptstruktur Abb. 2.2).

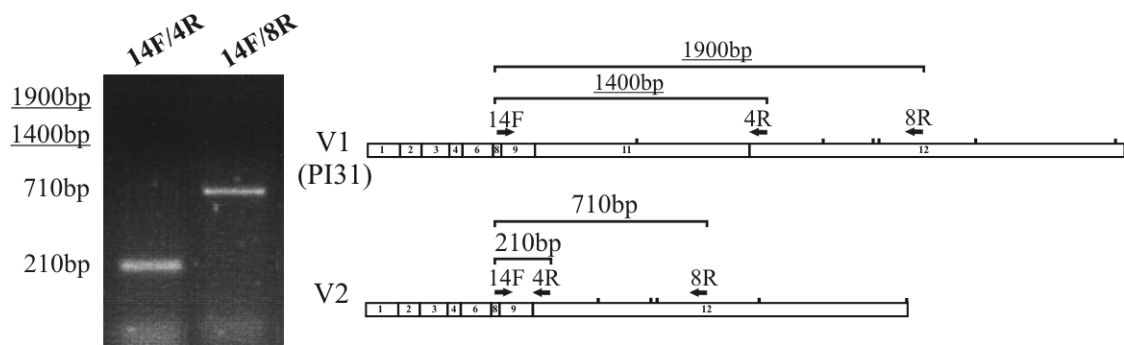


Abbildung 2.4: RT-PCR mit HeLa-RNA, in der PCR-Produkte mit abweichender Größe detektiert wurden. Mit den Primerpaaren 14F/4R und 14F/8R sollten ursprünglich die Fragmente von V1 (PI31) mit unterstrichener Sequenzlänge amplifiziert werden, stattdessen wurden jedoch etwa um 1000bp kürzere Fragmente detektiert. Die Sequenzierung ergab die Spleißvariante V2, der Exon 11 und damit 1200bp fehlen.

Für die weitere Charakterisierung der Spleißvarianten V1 bis V5 wurden sechs verschiedene humane Gewebe-cDNAs mittels PCR getestet, um eine mögliche Gewebespezifität, besonders bezüglich V5, zu überprüfen (Abbildung 2.5). Die Spleißvarianten V1 bis V4 konnten in allen untersuchten Geweben detektiert werden und wiesen überall eine relativ gleichmäßige starke Expression auf. Variante 5 hingegen, wurde am stärksten in Testikeln exprimiert und nur in sehr geringen Mengen in Gehirn, Milz und Plazenta. Auffällig war, daß in der PCR gegen V3 und V5 neben dem erwarteten Produkt noch weitere Amplifikate detektiert werden konnten. In der V3-PCR wurde im Dünndarm und in Testikeln ein um 100bp kleineres Produkt, in der V5-PCR dagegen im Gehirn eine etwa 100bp größere cDNA mit amplifiziert. Um diese PCR-Produkte zu identifizieren, wurden sie in den pCR2.1-Topo-Vektor kloniert und sequenziert. Es zeigte sich, daß es sich bei beiden Amplifikaten um weitere Spleißprodukte (V6 und V7) von *PSMF1* handelte (s. S. 14, Abb. 2.2).

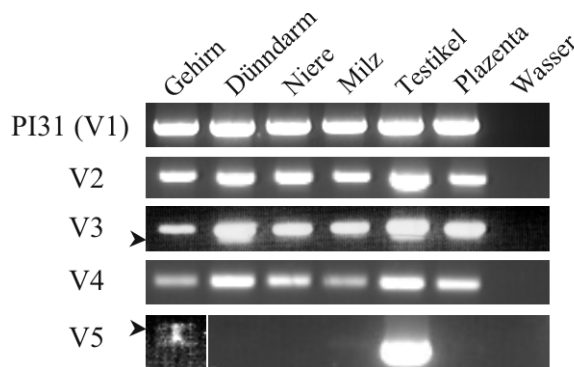


Abbildung 2.5: PCR mit gleichen Mengen humaner Gewebe-cDNAs gegen V1 bis V5. Die Spleißformen V1 bis V4 werden überall relativ gleichmäßig exprimiert, wohingegen V5 eine gewebespezifische Expression in Testikeln aufweist. Bei der PCR gegen V3 markiert der Pfeil die zusätzlichen Produkte im Dünndarm und Testikeln, die für V7 kodieren. Der Pfeil bei der PCR gegen V5 zeigt das verstärkt dargestellte zusätzliche Produkt im Gehirnanatz, das für V6 kodiert.

Die hier gefunden PI31-Isoformen V2 bis V5 sind inzwischen teilweise durch cDNA-Klone, die den kompletten *open reading frame* (ORF) beinhalten, in Datenbanken vertreten. Weiterhin existieren cDNA-Klone, die partiell mit den Varianten V6, V7, V8 und V10

übereinstimmen, d. h. sie bestätigen die An- oder Abwesenheit bestimmter Exonübergänge, sind aber am 5' oder 3'-Ende unvollständig. Soweit es möglich war, wurden die Varianten den entsprechenden Transkripten der Datenbank AceView (Version Apr07) zugeordnet (siehe Abb. 2.2). Es wurde kein cDNA-Klon gefunden, der das Fehlen von Exon 9 in einem Transkript beschreibt, so daß in dieser Arbeit mit V9 eine solche Spleißvariante erstmals beschrieben wurde.

In *PSMF1* gibt es mehrere überlappende, d. h. nicht durch Introns voneinander getrennte Exons (Exon 1/2, 5/6, 9/10 und 11/12), deren Spleißen durch die Nutzung von alternativen Donor- oder Akzeptorspleißstellen erfolgt. Weiterhin kann davon ausgegangen werden, daß die Expression von V5 und V6 durch einen alternativen Promotor im Intron III reguliert wird, da die Transkripte V5 und V6 einen anderen Transkriptionsstart mit Exon 5 aufweisen als alle anderen Varianten (Abb. 2.2).

Die Länge der 3'UTRs der einzelnen Transkripte kann variieren, da es in Exon 11 und 12 insgesamt sechs poly(A)-Signale an unterschiedlichen Positionen gibt. Drei davon (A4, 5, 6) entsprechen dem Standard-Signal (AATAAA), eins (A1) der Signal-Variante AATACA, sowie zwei (A2 und A3) den eher seltenen Varianten ACTAAA bzw. GATAAC.

Zur Veranschaulichung der Unterschiede aller neun Isoformen zu PI31 sind die Vergleiche der Aminosäuresequenzen im Anhang Seite 67 u. 68 in Abbildung 4.1 u. 4.2 dargestellt. Die Ergebnisse verdeutlichen, daß durch alternatives Spleißen eine Vielzahl unterschiedlicher Transkripte des PI31-Gens *PSMF1* entstehen können. Die potentiell resultierenden Proteine erfüllen möglicherweise auch gewebeabhängige Aufgaben, wie es die spezifische Expression von V5 in Testikeln vermuten läßt.

2.1.3 Northernblot-Analyse

Aufgrund der hohen Sensitivität der PCR-Methode, sollte mit Hilfe von RNA-Sonden zusätzlich im Northernblot überprüft werden, inwieweit verschiedene Transkripte von *PSMF1* detektiert werden können. Mit zwei verschiedenen Sonden (Abbildung 2.6A) wurden insgesamt fünf Transkripte unterschiedlicher Länge ($\sim 1,5\text{kb}$; $\sim 2\text{kb}$; $\sim 2,5\text{--}3\text{kb}$; $\sim 4\text{kb}$ und $\sim 5,5\text{kb}$) in der Gesamt-RNA von HeLa- und T2-Zellen detektiert (Abbildung 2.6B). Das ausschließlich von der Sonde S2 detektierte 2kb große Transkript, läßt sich von der Größe her der Spleißvariante V2 zuordnen. Deren mRNA unterscheidet sich durch das Fehlen des fast $1,2\text{kb}$ langen Exons 11 am stärksten von allen anderen Varianten, wobei durch Nutzung des poly(A)-Signals A5 ein Transkript von rund 2kb Länge entstehen kann (Abb. 2.6A).

Die eindeutige Identifizierung der im Northernblot detektierten Transkripte war nicht möglich, jedoch zeigen die Signale, daß verschiedene mRNAs des PI31-Gens in detek-

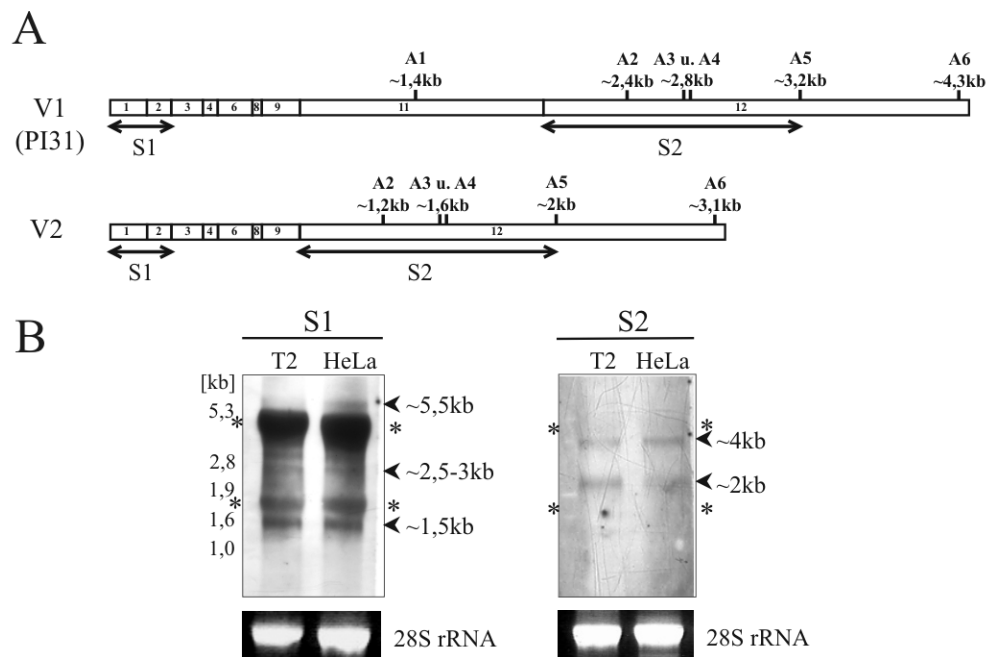


Abbildung 2.6: Northernblotanalyse mit zwei verschiedenen Sonden gegen die PI31-mRNA. **(A)** zeigt die Hybridisierungsposition der Sonden S1 und S2 am PI31-Transkript sowie am V2-Transkript. V2 ist durch das fehlende Exon 11 als einzige Variante theoretisch im Northernblot von den anderen Transkripten zu unterscheiden. **(B)** zeigt die Northernblots mit den Signalen der Sonden S1 und S2 gegen 2 μ g Gesamt-RNA aus HeLa- und T2-Zellen. Die Position der ribosomalen RNAs 28S und 18S wurden mit Sternchen markiert. Das Signal der Sonde S2 bei 2kb ist möglicherweise das V2-Transkript, alle anderen Signale sind nicht eindeutig zuzuordnen.

tierbarer Menge existieren, die auf die unterschiedliche Nutzung der sechs verschiedenen poly(A)-Signale und auf alternatives Spleißen zurückzuführen sind. In der weiteren Arbeit wurden neben PI31 noch die Spleißvarianten V2 bis V5 näher charakterisiert.

2.1.4 Stabilität der mRNA

Bei der Analyse der Exonzusammensetzung der einzelnen Varianten war auffällig, daß es bei V4 sowie V10 durch das fehlende Exon 4 zu einem verfrühten Stopcodon in Exon 6 kommt. Dadurch würde es, im Vergleich zu den anderen Transkripten, zur Translation stark verkürzter Proteine (V4=99AS und V10=61AS) kommen. Bei allen anderen Transkripten endet die kodierende Region in Exon 11 bzw. 12 bei V2 (siehe Abb. 2.2). Das ließ die Vermutung zu, daß die mRNAs von V4 und V10 möglicherweise falsch gespleißt wurden, da in der Regel Terminationscodons im letzten Exon der reifen mRNA zu finden sind (Nagy und Maquat, 1998). mRNAs mit solch einem verfrüht auftretendem Stopcodon werden normalerweise erkannt, dem *nonsense-mediated mRNA decay* (NMD) zugeführt und schnell degradiert. Der NMD stellt eine Qualitätskontrolle von neu transkribierten mRNAs dar und verhindert die Translation von fehlerhaften mRNAs in nutzlose oder potentiell gefähr-

liche Proteine. Durch die Behandlung von HeLa-Zellen mit dem Transkriptionsinhibitor α -Amanitin sollte deshalb geklärt werden, inwieweit es sich bei den Spleißvarianten V2, V3, und V4 um stabile Transkripte oder um evtl. fehlerhaft gespleißte mRNAs handelt. Die Stabilität des V5-Transkriptes konnte nicht untersucht werden, da durch dessen Gewebespezifität (siehe Abbildung 2.5) eine Amplifizierung aus HeLa- oder anderen untersuchten Zellen nicht erfolgreich war.

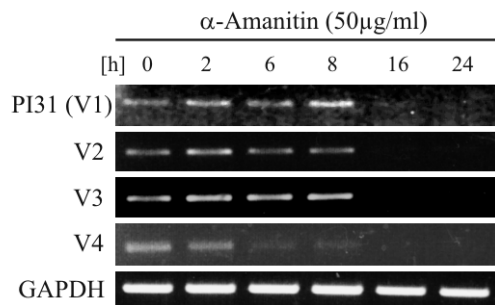


Abbildung 2.7: ; PCR gegen PI31, V2, V3 und V4 mit cDNA von HeLa-Zellen, die zur Überprüfung der mRNA-Stabilität für 0–24h mit dem Transkriptionsinhibitor α -Amanitin behandelt wurden. Die Transkripte V1 bis V3 sind für mindestens 8h stabil. Aufgrund rascher Degradation ist hingegen die mRNA von V4 nach 6h kaum noch detektierbar.

Es zeigte sich, daß die mRNAs von V2 und V3 auch nach 8h α -Amanitinbehandlung ähnlich stabil wie die von PI31 waren, wohingegen die V4-mRNA schon nach 6h Behandlung fast nicht mehr detektiert werden konnte (Abbildung 2.7). Diese schnelle Degradation ist neben dem frühen Stopcodon im Exon 6 ein weiterer Hinweis darauf, daß V4 ein Substrat des NMD ist. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß die geringe Stabilität der mRNA auf eine strenge Regulation zurückzuführen ist, wie es z. B. bei vielen regulatorischen Proteinen und Transkriptionsfaktoren der Fall ist (Yang et al., 2003). Ebenso gibt es wie bei allen Regeln auch beim NMD Ausnahmen, so daß die Möglichkeit besteht, daß das Protein V4 unter bestimmten Bedingungen *in vivo* exprimiert wird. Es wurde deshalb in die nachfolgenden Untersuchungen mit einbezogen.

2.2 Proteinbiochemische Charakterisierung

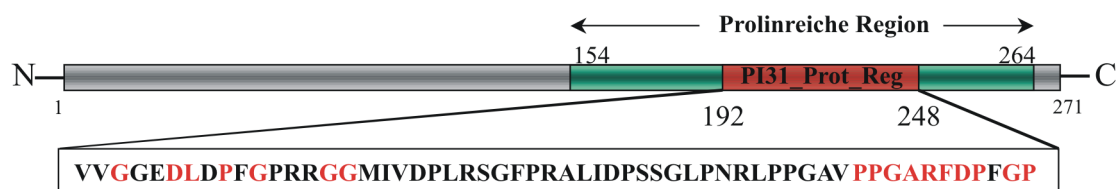


Abbildung 2.8: Schematische Darstellung von PI31 und der Position sowie Sequenz der PI31 Proteasome Regulator Domäne. Rot hervorgehoben sind die AS-Reste, die am stärksten in allen untersuchten Spezies konserviert sind, die nicht hervorgehobenen Reste sind zusätzlich fast nur in Wirbeltieren konserviert.

PI31 gehört zur Proteasom-Inhibitor-PI31-Familie, die PI31-Homologe von zahlreichen Tierspezies (Wirbeltiere bis Insekten) beinhaltet. Die Sequenzhomologien der jeweiligen

Proteine zum humanen PI31 reichen von 98% (Schimpanse) bis 27% (*Drosophila melanogaster*). Innerhalb der Säugetierklasse ist PI31 zu 90–98% konserviert. Laut der Proteinfamilien-Datenbank Pfam wurde ein 56AS langer Abschnitt (AS 192–248) des prolinreichen C-Terminus von PI31 als *PI31 Proteasome Regulator Domäne* definiert (Pfam: PI31_Prot_Reg, PF08577 und Interpro: IPR013886). Diese PI31-Domäne findet sich auch in Proteinen von Würmern, Pilzen und Pflanzen, wobei sich die höchste Konservierung auf die ersten und letzten 10–12AS der Domäne konzentriert (Abbildung 2.8). Beide Sequenzabschnitte weisen einen hohen Anteil an Prolin- und Glycinresten auf. Ein Vergleich von 44 PI31-Domänen von 37 Spezies wurde der Pfam-Datenbank entnommen und ist im Anhang auf Seite 69 in Abbildung 4.3 gezeigt.

2.2.1 Struktureller Vergleich der Proteine V1 bis V5

In Abbildung 2.9 ist ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der PI31-Isoformen V2 bis V5 mit PI31 (V1) dargestellt. Die Proteine V2 und V3 unterscheiden sich von PI31 nur in den

ClustalW-Alignment: Protein	
V1	MAGLEVLFASAAPAITCRQDALVCFLHWEVVTHGYFGLGVGDQPGPNDKKSELLPAGWNN 60
V2	MAGLEVLFASAAPAITCRQDALVCFLHWEVVTHGYCGLGVGDQPGPNDKKSELLPAGWNN 60
V3	MAGLEVLFASAAPAITCRQDALVCFLHWEVVTHGYCGLGVGDQPGPNDKKSELLPAGWNN 60
V4	MAGLEVLFASAAPAITCRQDALVCFLHWEVVTHGYCGLGVGDQPGPNDKKSELLPAGWNN 60
V5	-----MPKKLGPKSQ 11
V1	NKDLYVLRREYKDGSRKLLVKAITVESSMILNVLEYGSQQVADLTNLDDYDAEHLGDF 120
V2	NKDLYVLRREYKDGSRKLLVKAITVESSMILNVLEYGSQQVADLTNLDDYDAEHLGDF 120
V3	NKDLYVLRREYKDGSRKLLVKAITVESSMILNVLEYGSQQVADLTNLDDYDAEHLGDF 120
V4	NKDLYVLRREYKDGSRKLLVKAITVESSMILNVLDLQEQ----- 99
V5	QRGAVAPLTQVQQAACSPITYKQAKRNARSYQGRRRRRRCSONTTSRVPSQLQAVDSSAS 71
V1	HRTYKNSEELRSRIVSGIITPIHEQWEKANVSSPHREFFPATAREVDPLRIPPHPHPTSR 180
V2	HRTYKNSEELRSRIVSGIITPIHEQWEKANVSSPHREFFPATAREVDPLRIPPHPHPTSR 180
V3	HRTYKNSEELRSRIVSGIITPIHEQWEKANVSSPHREFFPATAREVDPLRIPPHPHPTSR 180
V4	-----
V5	CRITYKNSEELRSRIVSGIITPIHEQWEKANVSSPHREFFPATAREVDPLRIPPHPHPTSR 131
V1	QPPWCDPLGPFVVGEDLDPFGRPRGGMIVDPLRSGFPRALIDPSSGLPNRLPPGAVVPG 240
V2	QPPWCDPLGPFVVGEDLDPFGRPRGGMIVDPLRSGFPRALIDPSSGLPNRLPPGAVVPG 240
V3	QPPWCDPLGPFVVGEDLDPFGRPRGGMIVDPLRSGFPRALIDPSSGLPNRLPPGAVVPG 240
V4	-----
V5	QPPWCDPLGPFVVGEDLDPFGRPRGGMIVDPLRSGFPRALIDPSSGLPNRLPPGAVVPG 191
V1	ARFDPFGPIGTSPPGPNPDHLPDEGYDDMYL 271
V2	ARFDPFGPIGTSPPGPNPDHLP----- 263
V3	ARFDPFGPIGTSPPGYVVTQT----- 261
V4	-----
V5	ARFDPFGPIGTSPPGPNPDHLPDEGYDDMYL 222

Abbildung 2.9: Aminosäuresequenzvergleich von PI31 (V1) mit den Isoformen V2 bis V5. Die Sequenzunterschiede der Varianten im Vergleich zu PI31 sind grau unterlegt. Die prolinreichen Bindungsmotive der GYF-Domäne sind rot hervorgehoben und die Erkennungsmotive von SH3- bzw. WW-Domänen sind bei V1 unterstrichen. Aufgrund von Überschneidungen wurden diese hier nicht näher spezifiziert. Die Kernlokalisierungssequenz von V5 ist fett dargestellt.

letzten 16 AS des C-Terminus. Bei beiden fehlt somit das letzte Bindungsmotiv der prolinbindenden GYF-Domäne von CD2BP2 (Kofler et al., 2005a). V4 hingegen stellt eine stark

verkürzte Variante dar, die nur aus den ersten 99 N-terminalen Aminosäuren von PI31 besteht und somit nicht dessen prolinreichen C-Terminus besitzt. Aufgrund des von PI31 und allen anderen Varianten verschiedenen Translationsstarts (siehe Abbildung 2.2) hat V5 (neben V6) einen einzigartigen N-Terminus, der eine Kernlokalisierungssequenz beinhaltet. Der C-Terminus des Proteins ist jedoch identisch mit dem von PI31. Im prolinreichen Abschnitt der Proteine PI31, V2, V3 und V5 sind noch weitere potentielle Bindungsmotive von Proteindomänen, die prolinreiche Sequenzen erkennen, enthalten. So gibt es mindestens sechs potentielle Erkennungsmotive von SH3-Domänen sowie vier Bindungsmotive von WW-Domänen. Da sich die SH3- und WW-Motive teilweise überschneiden, wurden sie nicht näher spezifiziert (unterstrichene AS in Abb. 2.9). Die Vielzahl an unterschiedlichen potentiellen Bindungsmotiven im C-Terminus deutet darauf hin, daß dieser eine wichtige Rolle bei der Interaktion mit zellulären Partnern spielt.

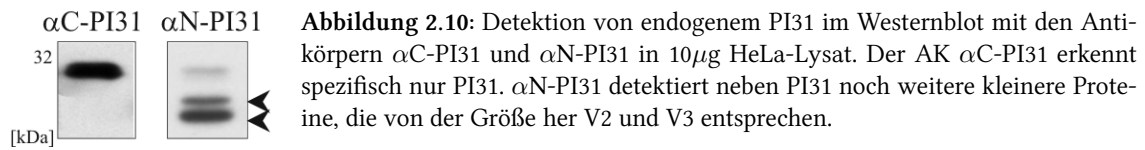
2.2.2 Proteinbiochemische Analyse von PI31 und der Isoformen

In Tabelle 2.1 wurden die proteinchemischen Eigenschaften der Proteine PI31 (V1) bis V5 zusammengestellt.

Eigenschaften	PI31 (V1)	V2	V3	V4	V5
Anzahl der Aminosäuren	271	263	261	99	222
Molekulargewicht [kDa]	29,8	28,9	28,7	10,9	24,4
Isoelektrischer Punkt	5,5	6,4	6,2	5,0	10,1

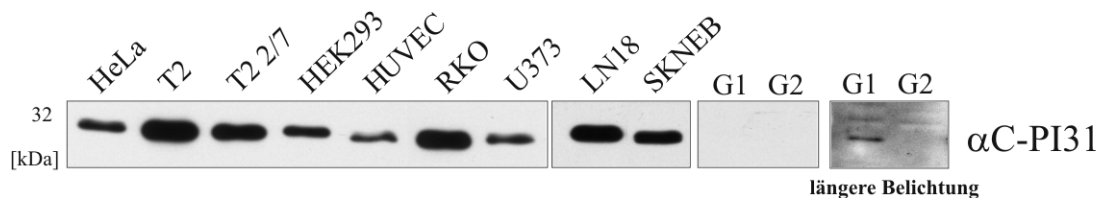
Tabelle 2.1: Proteinchemische Daten der Proteine PI31 (V1) bis V5

Für die biochemischen Untersuchungen zu PI31 wurden im Laufe der Arbeit polyklonale Antikörper (AK) gegen das Protein generiert. Es gelang, einen hochspezifischen Antikörper, gerichtet gegen die letzten dreißig Aminosäuren des C-Terminus von PI31 (AS 240–271; AK α C-PI31) sowie einen gegen den N-Terminus (AS 41–56; AK α N-PI31) gerichteten, zu erzeugen. Der AK α N-PI31 zeigt im Westernblot eine geringere Sensitivität gegenüber PI31 als α C-PI31, ist aber theoretisch in der Lage, die potentiellen Isoformen V2, 3 und 4 aufgrund des mit PI31 gleichen N-Terminus (siehe Abb. 2.9) zu erkennen. Tatsächlich werden auch im Westernblot mit diesem Antikörper weitere Proteine unter dem PI31-Signal detektiert (Abbildung 2.10), die vom Molekulargewicht den oben beschriebenen Isoformen V2 oder V3 entsprechen (siehe Tabelle 2.1). Es bleibt jedoch unklar, ob es sich wirklich um Isoformen von PI31 handelt oder um eine Kreuzreaktion des Antikörpers.



Proteinexpression von PI31 in verschiedenen Zelllinien

Um zu überprüfen, ob sich die Expression von PI31 in unterschiedlichen Zelllinien unterscheidet, wurden gleiche Mengen Gesamtzelllysate diverser Zellen im Westernblot mit dem Antikörper α C-PI31 untersucht. Zusätzlich wurde auch Gesamtproteinextrakt aus zwei verschiedenen humanen Gehirnen des Frontalkortex (G1 und G2) getestet (Abbildung 2.11). PI31 konnte in den Gesamtzelllysaten aller untersuchten Zelllinien detektiert werden.



Die Basalexpression war in T2-, T2-2/7-, RKO-Zellen sowie in den beiden Glioblastom-Zelllinien LN18 und SKNEB am höchsten und in HUVEC- sowie U373-Zellen am geringsten. Interessanterweise ließ sich PI31 in den Gehirnen G1 und G2 nur sehr schlecht nachweisen. Angesichts der gut detektierbaren mRNA von PI31 im Gehirn (siehe S. 16, Abb. 2.5), läßt sich das Ergebnis des Westernblots evtl. auf eine geringe Translationseffizienz zurückführen.

Des weiteren wurde untersucht, ob sich das Migrationsverhalten im Saccharosedichtegradienten von PI31 in verschiedenen Zelllinien aufgrund möglicher Komplexbildungen unterscheidet. Dazu wurden jeweils 4mg Proteinextrakt von HeLa-, T2-, T2-2/7- oder U373-Zellen in einem 10 bis 40%igen Saccharosegradienten ultrazentrifugiert. Das endogene PI31 migrierte bei allen untersuchten Zelllinien hauptsächlich in den niedermolekularen Fraktionen 18–20 (Abbildung 2.12). Dieses Ergebnis ist konsistent mit den Beobachtungen von McCutchen-Maloney et al. (2000), die gereinigtes rekombinantes PI31 im Glyceroldichtegradienten ebenfalls in den niedermolekularen Fraktionen nachwies. Es läßt außerdem die Schlußfolgerung zu, daß PI31 nicht mit größeren Proteinkomplexen assoziiert zu sein scheint.

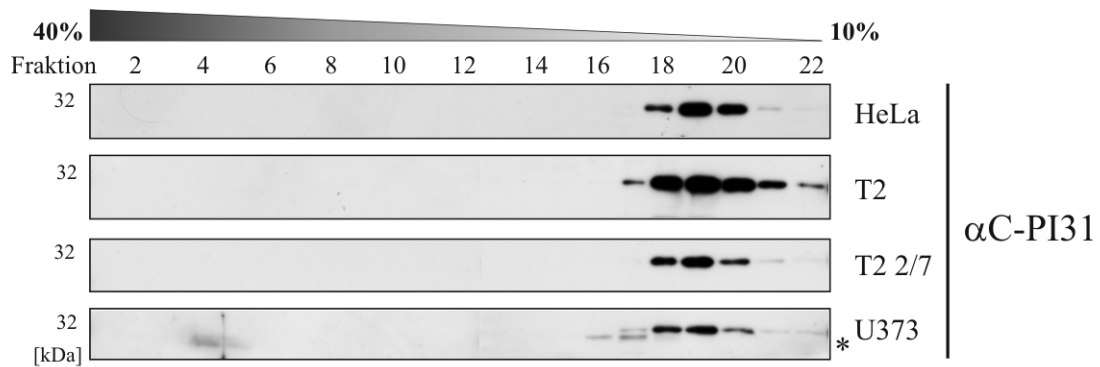


Abbildung 2.12: Migrationsverhalten von PI31 verschiedener Zelllinien im 10–40%igen Saccharosedichtegradienten. Jeweils 4mg Gesamtzelllysate wurde im Dichtegradienten ultrazentrifugiert und die einzelnen Fraktionen im Westernblot mit dem Antikörper α C-PI31 getestet. PI31 migriert in allen untersuchten Zelllinien hauptsächlich in den niedermolekularen Fraktionen 18–20. Der Stern bei U373 markiert eine kleinere unbekannte Bande.

Proteinexpression der Isoformen

Da nicht geklärt ist, ob die Proteine V2 bis V5 exprimiert werden, erfolgte die Klonierung der jeweiligen cDNA in den Expressionsvektor pcDNA3.1, um sie durch Überexpression in HeLa-Zellen näher zu charakterisieren. Es wurde zuerst getestet, inwieweit die PI31-spezifischen Antikörper α C-PI31 und α N-PI31 in der Lage sind, die überexprimierten Varianten im Westernblot zu erkennen. Dazu wurden HeLa-Zellen für 16h mit den fünf klonierten Varianten einschließlich PI31 (V1) transfiziert und anschließend die Gesamtzelllysate im Westernblot getestet (Abbildung 2.13). Es zeigte sich, daß sich V2, V3 und V4 wie

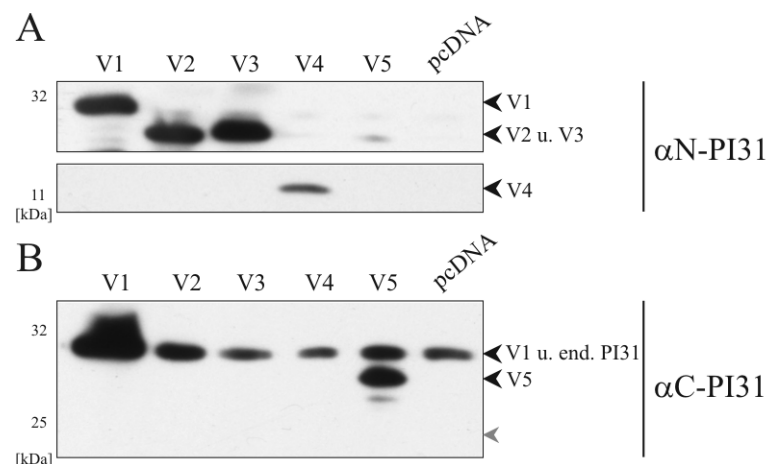


Abbildung 2.13: Westernblot mit Gesamtzelllysaten von HeLa-Zellen die mit den Expressionsplasmiden V1 bis V5 für 16h transfiziert wurden. **(A)** Die überexprimierten Isoformen V1 bis V4 konnten mit α N-PI31 detektiert werden, **(B)** α C-PI31 detektierte nur die überexprimierten Proteine V1 und V5 sowie endogenes PI31. V5 migrierte mit einem höheren Molekulargewicht als erwartet. Der graue Pfeil markiert die theoretische Position von V5.

vermutet mit α N-PI31 detektieren ließen, wohingegen V5 ausschließlich durch α C-PI31 erkannt wurde. Die Proteine V2–V4 migrierten entsprechend der Größenordnung ihres theoretischen Molekulargewichts, wobei V4 erst nach langer Belichtung detektiert wurde, was auf eine geringe Expression oder einen schnellen Abbau schließen läßt. Auffällig war hingegen, daß V5 in der SDS-PAGE nicht wie erwartet bei 24–25kDa migrierte, sondern bei einer Größe von 28–29kDa detektiert wurde. Das veränderte Laufverhalten läßt sich möglicherweise durch die hohe Anzahl an basischen Aminosäuren im N-Terminus und/oder posttranslationale Modifizierungen erklären.

Durch Ultrazentrifugation von Lysaten mit den überexprimierten Isoformen V1, V2, V3 und V5 im Saccharosedichtegradienten wurde weiterhin untersucht, wie sich deren Migration im Vergleich zu endogenem PI31 verhält (Abbildung 2.14). Da V4 sich nur schwer detektieren ließ (siehe Abb. 2.13), wurde es nicht in diese Untersuchung mit einbezogen.

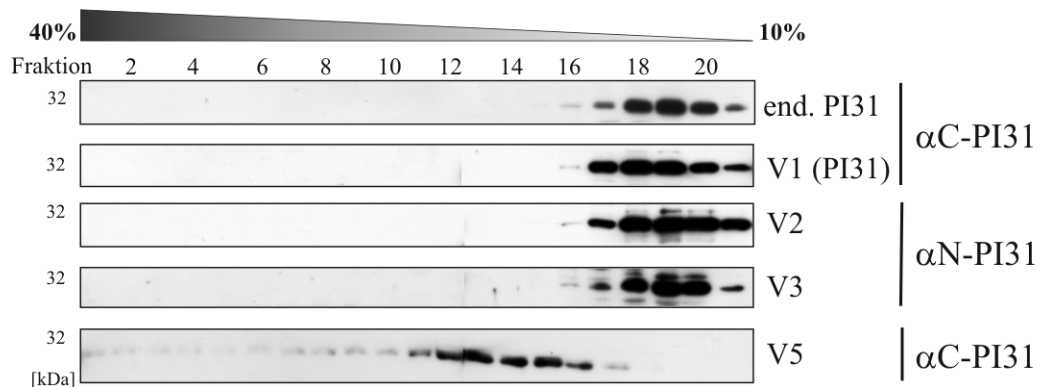


Abbildung 2.14: Migrationsverhalten der überexprimierten Isoformen V1 bis V5 in 10–40%igen Saccharosedichtegradienten im Vergleich zu endogenem PI31. HeLa-Zellen wurden für 16h mit den entsprechenden Expressionsplasmiden transfiziert. Daraufhin wurden jeweils 4mg Gesamtzelllysate im Dichtegradienten ultrazentrifugiert und die Fraktionen im Westernblot mit den Antikörpern α C-PI31 u. α N-PI31 analysiert. Die Proteine V1 bis V3 ließen sich in den Fraktionen geringer Dichte (16–21) detektieren und zeigten das gleiche Migrationsverhalten wie endogenes PI31. V5 migrierte hingegen in Fraktionen höherer Dichte (11–16) sowie zusätzlich im hochmolekularen Bereich der Fraktionen 1–10.

Die Proteine V1–V3 wurden in den Fraktionen geringer Dichte 16–21 detektiert und unterschieden sich in ihrem Migrationsverhalten nicht vom endogenen PI31. Hingegen gab V5 ein Signal in den Fraktionen 11–16 und konnte zusätzlich noch in den hochmolekularen Fraktionen 1–10 detektiert werden. Die, im Vergleich zu PI31 (V1), abweichende Lokalisierung von V5 in den Fraktionen höherer Dichte läßt darauf schließen, daß das Protein möglicherweise mit größeren Proteinkomplexen interagiert.

Subzelluläre Lokalisierung von PI31 und V5

In murinen Zellen ist PI31 hauptsächlich cytoplasmatisch an der ER-Membran lokalisiert (Zaiß et al., 2002). Dieses Ergebnis konnte in humanen HeLa-Zellen bestätigt werden, in-

dem indirekte Immunfluoreszenzaufnahmen mit den PI31-spezifischen Antikörpern α C-PI31 und α N-PI31 angefertigt wurden (Abbildung 2.15). Mit beiden Antikörpern war eine eindeutige ER- sowie cytosolische Lokalisierung zu beobachten (Abbildung 2.15A). Da der AK α N-PI31 in der Lage ist, neben PI31 auch die Isoformen V2, V3 und V4 zu erkennen, kann nicht ausgeschlossen werden, daß diese Proteine ebenfalls detektiert wurden, sofern eine endogene Expression besteht. Die Kolokalisierung von PI31 mit dem ER konnte mit einem gegen das ER-ständige Protein Calnexin gerichteten Antikörper bestätigt werden.

Die Zellen wurden zusätzlich mit einem spezifischen Antikörper gegen das gesamte Proteasom (α 20S) gefärbt, der die Verteilung des Proteasoms im Cytoplasma und im Zellkern zeigte (Abbildung 2.15B). Die Überlagerung der Aufnahmen mit den PI31-Fluoreszenzen zeigte, daß eine Kolokalisierung von PI31 mit dem Proteasom am ER und im Cytoplasma möglich ist.

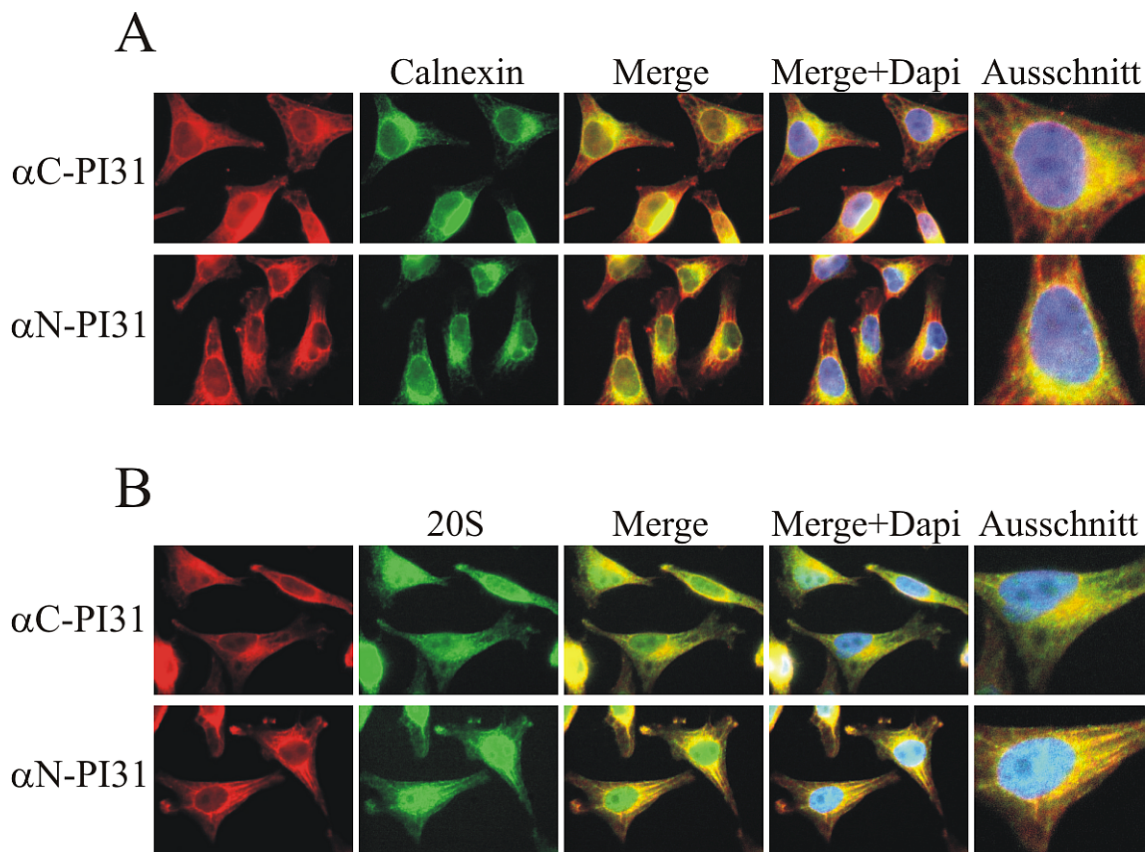


Abbildung 2.15: Aufnahmen indirekter Immunfluoreszenzen von HeLa-Zellen zur intrazellulären Detektion von endogenem PI31. HeLa-Zellen wurden mit den PI31-spezifischen Antikörpern α C-PI31 und α N-PI31 inkubiert und diese mit dem farbstoffgekoppelten Zweitantikörper α Kaninchen-Alexa 568 (rot) detektiert. **(A)** Das ER-ständige Protein Calnexin wurde mit einem spezifischen Calnexin-Antikörper und dem Zweitantikörper α Maus-Alexa 488 (grün) detektiert. Die Überlagerung (Merge) sowie der Ausschnitt verdeutlichen die Lokalisierung von PI31 am ER. **(B)** Die Lokalisierung des Proteasoms wurde mit einem Antikörper gegen das gesamte Proteasom (20S) und dem Zweitantikörper α Maus-Alexa 488 (grün) gezeigt. Die Überlagerung und der Ausschnitt hebt die mögliche Kolokalisierung von PI31 mit dem Proteasom hervor (Dapi = Kernfärbung).

Um die gezeigte cytoplasmatische Lokalisierung mit einer anderen Methode zu überprüfen, wurden zusätzlich Cytosol- und Kernfraktionen von HeLa-Zellen hergestellt und davon jeweils 2 μ g im Westernblot auf das Vorhandensein von PI31 getestet (Abbildung 2.16A). Mit dieser Methode konnte PI31 durch die Antikörper α C-PI31 und α N-PI31 fast ausschließlich im Cytosol detektiert werden. Das sehr schwache Signal in einer Kernfraktion läßt sich auf die hohe Sensitivität des Antikörpers α C-PI31 zurückführen und rührt vermutlich von einer nicht vollständigen Fraktionierung her.

Es wurde außerdem eine Zellfraktionierung von HeLa-Zellen in cytosolische und membrangebundene Proteine durchgeführt, um die Art der ER-Lokalisierung von PI31 zu ermitteln. Von den Fraktionen wurden ebenfalls jeweils 2 μ g im Westernblot mit dem N- und C-terminal spezifischen Antikörper getestet (Abbildung 2.16B). Es bestätigte sich die cytoplasmatische Lokalisierung von PI31 ohne eine direkte Membranassoziiierung. Der N-terminal gerichtete Antikörper detektierte allerdings auch ein schwaches Signal in der Membranfraktion, wobei es sich aber nicht um PI31 handelte, sondern um eines der vom Antikörper zusätzlich erkannten Proteine in der Größenordnung von V2 und V3 (siehe auch Abbildung 2.10).

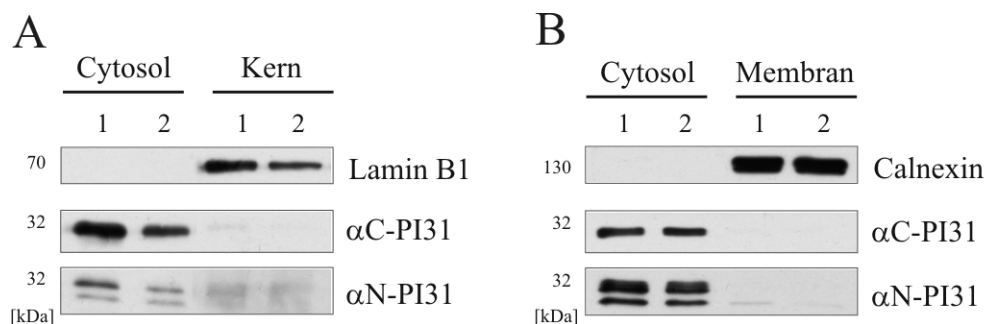


Abbildung 2.16: Lokalisierung von PI31 in verschiedenen zellulären Kompartimenten. **(A)** Westernblot mit den PI31-spezifischen Antikörpern α C-PI31 und α N-PI31 gegen Cytosol/Kernfraktionen sowie **(B)** Cytosol/Membranfraktionen von HeLa-Zellen. Als Positivkontrolle in (A) diente das im Zellkern lokalisierte Protein Lamin B1 und in (B) das ER-ständige Protein Calnexin. PI31 ist in beiden Fraktionierungsexperimenten fast ausschließlich in den löslichen Cytosolfractionen anzutreffen.

Die PI31-Isoform V5 besitzt im N-Terminus eine potentielle Kernlokalisierungssequenz (s. S. 20, Abb. 2.9), deren Funktionalität mit Hilfe von EGFP¹-Fusionen geklärt werden sollte. Die cDNA von V5 wurde dazu in die Vektoren pEGFP-C3 und -N3 (Promega) kloniert, um Fusionsproteine mit einem N- und C-terminalen EGFP zu erhalten. Nach Transfektion von HeLa-Zellen mit diesen Expressionsplasmiden für 16h wurden Fluoreszenzaufnahmen gefertigt. In Abbildung 2.17 wird deutlich, daß V5-EGFP ausschließlich im Zellkern lokalisiert, wohingegen EGFP allein gleichmäßig im Cytosol und im Zellkern verteilt vorliegt. Es

¹enhanced green fluorescence protein

wurde in Abb. 2.17 nur die Fluoreszenz des C-terminal markierten V5-Proteins gezeigt, da sich die intrazelluläre Lokalisierung durch das N-terminale EGFP nicht veränderte. Damit konnte die Funktionalität der Kernlokalisierungssequenz von V5 eindeutig nachgewiesen werden. Zusammen mit der Gewebespezifität sowie dem zu PI31 unterschiedlichen Migrationsverhalten im Dichtegradienten, macht dieses Ergebnis die Isoform V5 zu einem sehr außergewöhnlichen Mitglied der PI31-Proteinfamilie.

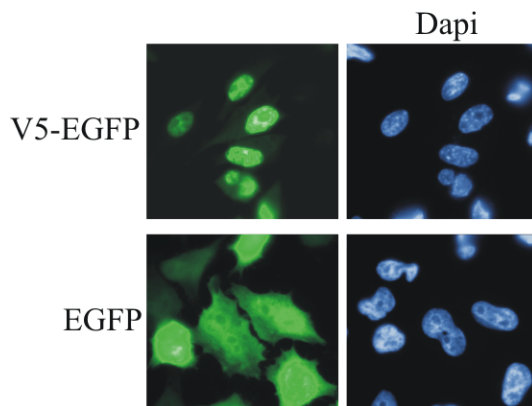


Abbildung 2.17: Fluoreszenzaufnahmen der intrazellulären Lokalisierung von V5-EGFP. HeLa-Zellen wurden für 16h mit dem Expressionsplasmid V5-EGFP oder mit dem Leervektor pEGFP transfiziert. Aufgrund der Kernlokalisierungssequenz im N-Terminus von V5 lokalisiert diese PI31-Isoform ausschließlich im Zellkern (Dapi = Zellkernfärbung).

2.3 Regulation von PI31

2.3.1 Einfluß von Typ I-Interferonen und dsRNA auf die Expression

Im murinen System wurde gezeigt, daß eine virale Infektion die Transkription und Translation von PI31 induziert (Zaiß, 2000). Im Rahmen der angeborenen Immunabwehr stellt die Sezernierung von inflammatorischen Cytokinen wie $\text{IFN}\alpha$ und β eine erste Antwort auf Infektionen dar. Um im humanen System zu überprüfen, inwieweit die virale Induktion von PI31 auf die Wirkung von Typ I-Interferonen zurückzuführen ist, wurden HeLa-Zellen über einen Zeitraum von 24h mit $\text{IFN}\alpha$ sowie bis zu 48h mit $\text{IFN}\beta$ stimuliert und Proben zu verschiedenen Zeitpunkten genommen. Die Expression von PI31 wurde daraufhin mittels RT-PCR auf RNA-Ebene und durch Westernblot von Gesamtzelllysaten auf Proteinebene analysiert.

Es konnte eine $\text{IFN}\alpha$ -induzierte transiente Zunahme der mRNA-Menge von PI31 zwischen 6 und 14h verzeichnet werden sowie eine leichte Erhöhung der Proteinmenge nach 24h (Abbildung 2.18A). Auch nach $\text{IFN}\beta$ -Stimulation kam es, ähnlich wie bei $\text{IFN}\alpha$, zu einer Zunahme der PI31-mRNA zwischen 5 und 14h (Abbildung 2.18B).

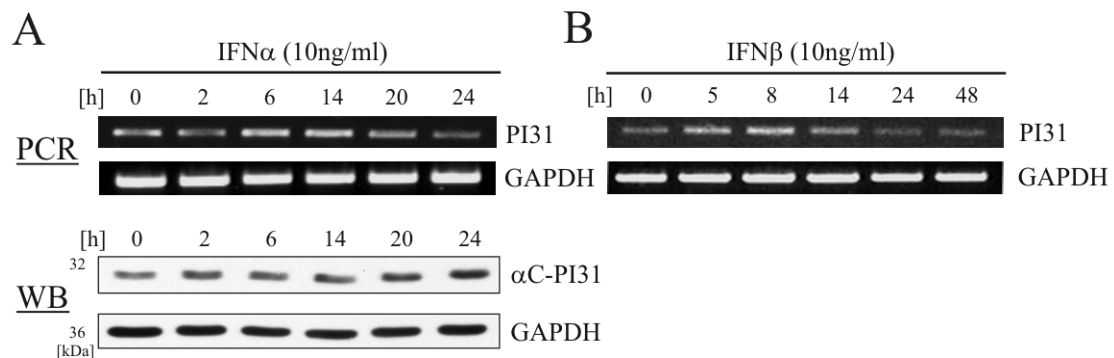


Abbildung 2.18: Einfluß von Typ I-Interferonen auf die Expression von PI31. **(A)** HeLa-Zellen wurden für 0–24h mit 10ng/ml IFN α behandelt und die mRNA-Expression von PI31 mittels RT-PCR analysiert. Der Nachweis von PI31 im Gesamtzelllysate erfolgte im Westernblot (WB) durch den Antikörper α C-PI31. Auf RNA-Ebene kam es zu einer transienten Zunahme von PI31 zwischen 6 und 14h. Die PI31-Proteinmenge erhöhte sich nach 24h. **(B)** HeLa-Zellen wurden für 0–48h mit 10ng/ml IFN β stimuliert und die Expression von PI31 auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR überprüft. Es war ebenfalls eine transiente Zunahme der mRNA-Menge von PI31 zwischen 5 und 14h zu verzeichnen.

Während der Replikation von fast allen Viren entsteht doppelsträngige RNA (dsRNA), die von der Zelle als fremd erkannt wird und eine antivirale Antwort auslöst (Jacobs und Langland, 1996). Ein geeignetes synthetisches Analogon von dsRNA ist poly(IC)², weshalb es häufig für die Simulierung von Virusinfektionen eingesetzt wird. Um nun zu untersuchen,

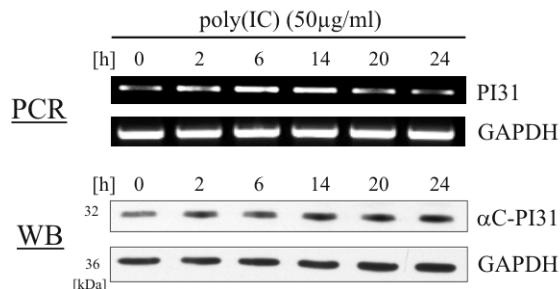


Abbildung 2.19: Einfluß von poly(IC) auf die PI31-Expression. HeLa-Zellen wurden für 0–24h mit 50 μ g/ml poly(IC) behandelt und die zeitliche Expression von PI31 in der RT-PCR und im Westernblot überprüft. Die Menge der PI31-mRNA nahm zwischen 6 und 14h zu und die Proteinmenge steigerte sich leicht nach 24h.

ob poly(IC) ebenfalls einen positiven Effekt auf die Expression von PI31 hat, wurden HeLa-Zellen für 0–24h mit 50 μ g/ml poly(IC) stimuliert. Tatsächlich kam es durch diese Behandlung zu einer Steigerung der mRNA-Menge von PI31 zwischen 6 und 14h und ebenfalls zu einem leichten Anstieg der Proteinmenge nach 24h (Abbildung 2.19). Um den Effekt von poly(IC) auf die Expression von PI31 zu verstärken, wurde der *Toll-like-Rezeptor 3* (TLR3) in HeLa-Zellen für 24h transient überexprimiert und die Zellen daraufhin mit 50 μ g/ml poly(IC) für 5 und 17h behandelt (Abbildung 2.20A). Wider Erwarten war, trotz Überexpression dieses Rezeptors für dsRNA, keine verstärkte Zunahme der PI31-mRNA zu verzeichnen; sie war eher schwächer als in den Kontrollzellen. Auf Proteinebene konnte eine leichte Induktion von PI31 in den TLR3-transfizierten Zellen detektiert werden, die Basalexpression blieb jedoch geringer als in der Kontrolle. Aus Abbildung 2.20B geht hervor,

²polyinosine-polycytidylic acid

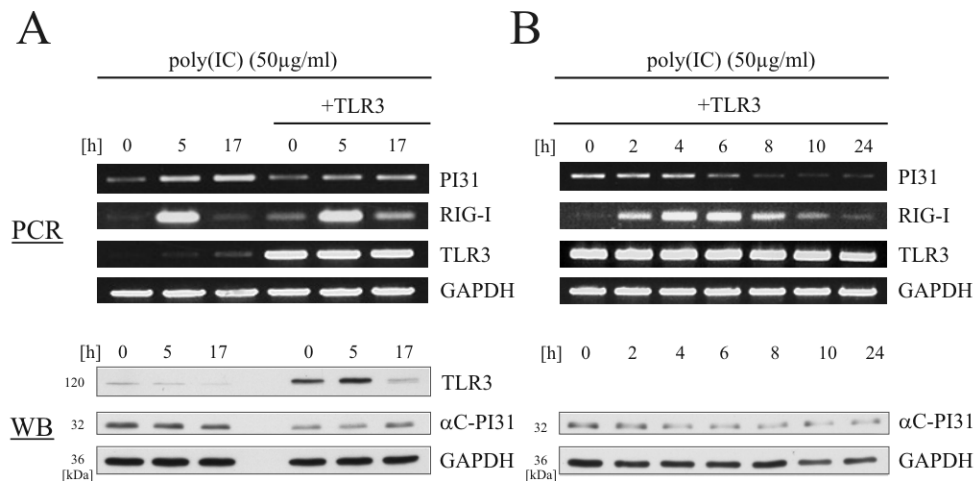


Abbildung 2.20: Einfluß von poly(IC) auf die Expression von PI31 in TLR3-transfizierten HeLa-Zellen. HeLa-Zellen wurden für 24h mit dem pUNO-hTLR3 Expressionsplasmid transfiziert und daraufhin für **(A)** 5 und 17h und **(B)** 0–24h mit 50μg/ml poly(IC) behandelt. Die Analyse der PI31-Expression erfolgte mittels RT-PCR und Westernblot, wobei die RNA-Helikase RIG-I als Positivkontrolle der poly(IC)-Stimulation in der RT-PCR beider Versuche diente. Durch die Überexpression von TLR3 kam es jedoch zu keiner Verstärkung des positiven Effekts von poly(IC) auf die PI31-Expression.

daß auch nach 24h poly(IC)-Stimulation kein positiver Einfluß der TLR3-Überexpression auf die Expression von PI31 zu beobachten war.

Die bisherigen Ergebnisse lassen darauf schließen, daß die Induktion von PI31 durch poly(IC) nicht durch TLR3 vermittelt wird. Möglicherweise beruht die gesteigerte Expression auf den Signalwegen anderer zellulärer dsRNA-Rezeptoren wie z. B. RIG-I oder Mda-5, was jedoch noch untersucht werden muß.

2.3.2 Promotorstudien

Mit Hilfe von Reportergenstudien sollte untersucht werden, ob die gesteigerte Expression von PI31 nach poly(IC) und IFN α Stimulation auf eine erhöhte Promotoraktivität zurückzuführen ist. Weiterhin wurde angestrebt, die potentiellen regulatorischen Möglichkeiten der 3' untranslatierten Region (3'UTR) der mRNA von PI31 näher zu charakterisieren. Zunächst wurde analysiert, welche Transkriptionsfaktoren theoretisch im Bereich der 5'UTR sowie in der Promotorsequenz bis zu 1,5kb aufwärts des potentiellen Transkriptionsstarts binden können. Mit Hilfe eines Vorhersageprogrammes konnten mehrere mögliche Bindungsstellen von Transkriptionsfaktoren identifiziert werden, die an der Regulation von sogenannten *viral stress-inducible genes* (Sen und Peters, 2007) beteiligt sind (Abbildung 2.21). In der 5'UTR liegen drei potentielle NF- κ B-Bindungsstellen, im 1,5kb-Promotorabschnitt mehrere Erkennungssequenzen für AP-1³ sowie jeweils eine ATF-2⁴

³activating protein-1

⁴activating transcription factor

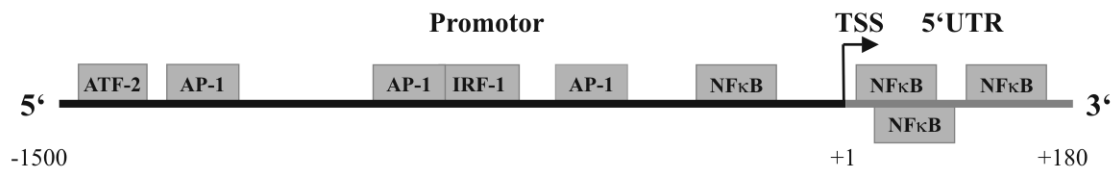


Abbildung 2.21: Schematische Darstellung der Promotor- und 5'UTR-Region von PI31 mit potentiell bindenden Transkriptionsfaktoren und die ungefähre Position ihrer Bindungsstellen. Die Zahlen geben die Länge in Basenpaaren an (Vorhersageprogramm AliBaba2.1; TSS = Transkriptionsstart).

und IRF-1⁵ Bindungsstelle. Diese Transkriptionsfaktoren können alle u. a. durch dsRNA aktiviert werden (Reis et al., 1992; Sen und Peters, 2007), wobei IRF-1 zusätzlich IFN-induzierbar ist (Harada et al., 1989).

Es wurde daraufhin die 1,5kb lange Promotorregion mit und ohne 5'UTR vor ein Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT)-Reportergen kloniert (Abbildung 2.22, pCAT-1 bzw. 2). Zusätzlich wurde eine CAT-Reportergenfusion hergestellt, die nur die 5'UTR beinhaltete (pCAT-3). Um einen möglichen regulatorischen Einfluß der 3'UTR der PI31-mRNA

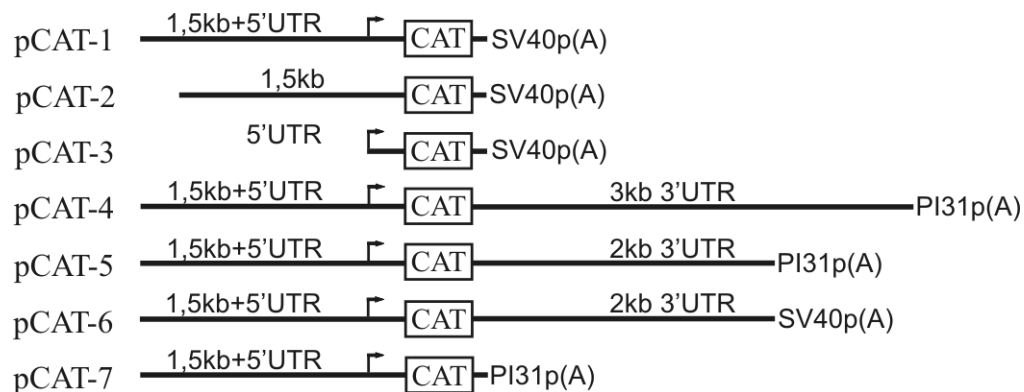


Abbildung 2.22: Übersicht der verwendeten CAT-Reportergenplasmide pCAT-1 bis 7 zur Veranschaulichung der klonierten Promotorbereiche bzw. 3'UTR von PI31 [p(A) = poly(A)-Signal].

auf die Expression zu überprüfen, wurde außerdem ein Reportergenplasmid hergestellt, das die ca. 3kb lange 3'UTR von PI31 hinter dem CAT-Gen enthielt. In ein weiteres Plasmid wurde die um etwa 1,2kb kürzere 3'UTR (~2kb) der Spleißvariante V2 kloniert, der möglicherweise potentielle regulatorische Elemente fehlen (siehe Transkriptstruktur S. 14, Abb. 2.2). Reportergenplasmide besitzen in der Regel das poly(A)-Signal des Simian Virus 40 (SV40), das für die Polyadenylierung der entstehenden Reporter-mRNA sorgt und somit deren korrekte Translation gewährleistet. Für die Klonierung der 3'UTR von PI31 und V2 wurde das SV40-poly(A)-Signal des Promotorkonstrukts pCAT-1 entfernt und an dessen Stelle die 3'UTR eingefügt (pCAT-4 u. 5, Abb. 2.22). Die Transkription und Translation

⁵interferon regulatory factor-1

des Reportergens hing somit vom PI31-Promotor sowie von den 3'UTR-internen poly(A)-Signalen ab.

Um zu bestimmen, ob das Fehlen des SV40-poly(A)-Signals evtl. die Translation beeinträchtigt, wurde als Kontrolle ein Plasmid hergestellt, in dem hinter die 2kb lange 3'UTR das SV40-poly(A)-Signal wieder eingesetzt wurde (pCAT-6, Abb. 2.22). Als eine weitere Kontrolle diente pCAT-7. In dieses Reportergenplasmid wurde anstelle einer 3'UTR und des SV40-poly(A)-Signals das PI31-eigene poly(A)-Signal A6 direkt hinter das CAT-Gen eingefügt, um dessen Einfluß auf die Expression, unabhängig von potentiellen regulatorischen Sequenzen der 3'UTR, zu überprüfen. Die Expression des Reportergens CAT wurde daraufhin mittels ELISA und RT-PCR nachgewiesen (Abb. 2.23 und 2.24). Unter der Kon-

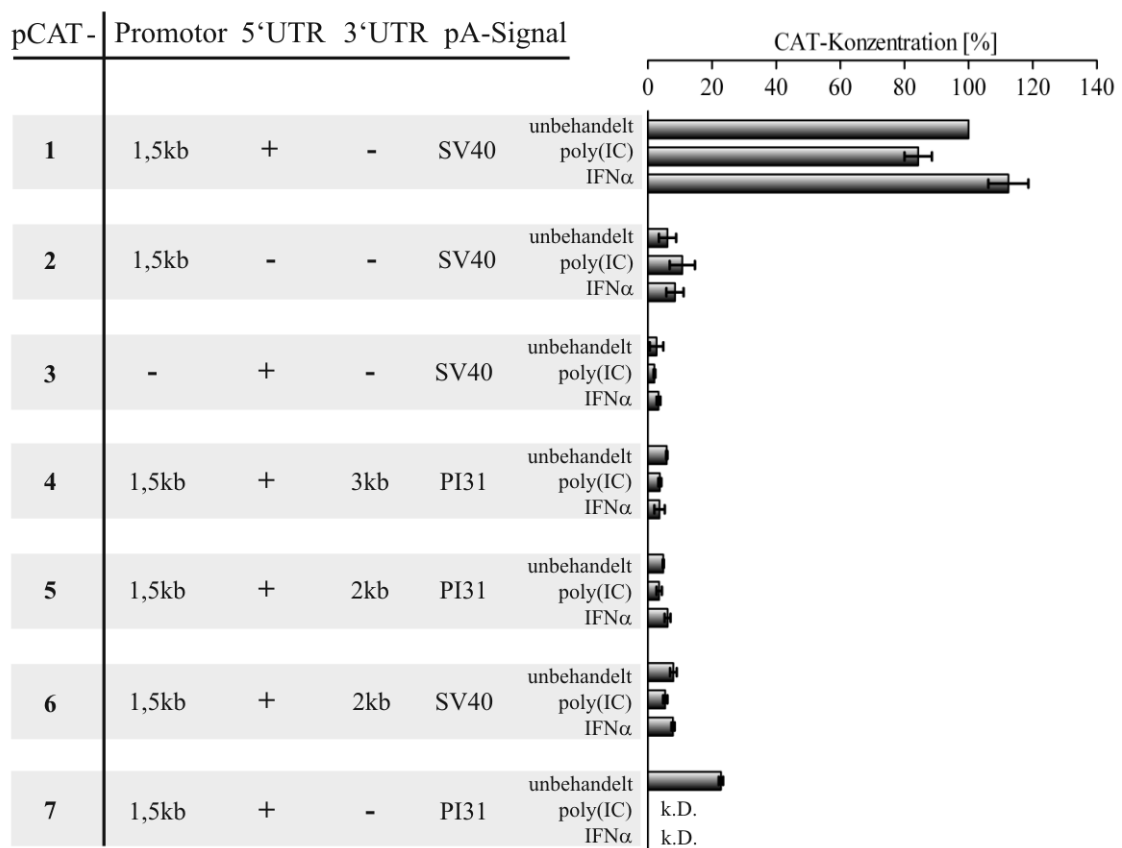


Abbildung 2.23: Aufbau der pCAT-Konstrukte und Ergebnisse des Reportergen-Assays (ELISA). HeLa-Zellen wurden mit 0,8 μ g Plasmid für 16h transfiziert und daraufhin für 8h mit poly(IC) (25 μ g/ml) oder IFN α (10ng/ml) stimuliert oder unbehandelt gelassen. Die Expression des Reportergens CAT wurde mit einem CAT-spezifischen ELISA gemessen. Alle Werte beziehen sich auf pCAT-1 „unbehandelt“, der gleich 100% gesetzt wurde. Nur das Konstrukt pCAT-1 mit 1,5kb langem Promotor und der 5'UTR zeigte eine starke Expression des Reportergens. Alle anderen Konstrukte wurden nur sehr gering exprimiert, wobei die 3'UTR von PI31 (pCAT-4 bis 6) einen inhibitorischen Einfluß auf die Expression hat. Die Stimulation der Zellen mit poly(IC) senkte wider Erwarten die Expression des Reportergens. IFN α steigerte die Expression um etwa 20% (k. D. = keine Daten).

trolle des PI31-Promotors mit der 5'UTR-Sequenz (pCAT-1) konnte in Lysaten von unbehandelten HeLa-Zellen eine starke Expression des CAT-Reportergens im ELISA gemessen werden. Ohne die 5'UTR (pCAT-2) nahm die gemessene CAT-Konzentration hingegen um mehr als 90% ab (Abb. 2.23). Die 5'UTR ohne davorliegender Promotorsequenz (pCAT-3) induzierte ebenfalls nur eine extrem geringe Expression. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die untranslatierte 5'-Region der PI31-mRNA wichtige regulatorische Elemente besitzt, diese aber nur in Verbindung mit davor liegenden Sequenzelementen im Promotor für eine starke Expression sorgen.

Die Untersuchungen zum regulatorischen Einfluß der 3'UTR (pCAT-4 u. 5) von PI31 bzw. V2 auf die Expression des Reportergens zeigten, daß es sowohl mit der 3kb als auch der 2kb langen 3'UTR nur zu einer marginalen Expression des Reportergens kommt (Abb. 2.23). Der beobachtete Effekt war zudem unabhängig von der Art des poly(A)-Signals, da das Einfügen des viralen poly(A)-Signals von SV40 hinter die 3'UTR keine signifikante Steigerung der Expression erbrachte (pCAT-6). Dies bestätigten auch die Versuche mit dem Reporterplasmid, das anstelle der 3'UTR und des SV40-poly(A)-Signals nur das PI31-poly(A)-Signal enthielt (pCAT-7). Die gemessene Konzentration des Reportergens CAT war um fast 70% geringer als bei pCAT-1, lag jedoch deutlich über den Werten, die mit den 3'UTR-Konstrukten gemessen wurden (Abb. 2.23).

Diese Ergebnisse zeigen, daß das natürliche poly(A)-Signal von PI31 zwar eine viel geringere Expression hervorruft als das virale Signal, aber die Expression durch regulatorische Sequenzen in der 3'UTR eindeutig inhibiert wird. Außerdem läßt sich aus den Versuchen mit der 2kb langen 3'UTR von V2 schließen, daß die inhibitorisch wirksamen Sequenzelemente nicht in dem fehlenden 1,2kb langen Abschnitt lokalisiert sind.

Parallel zu diesen Versuchen mit unbehandelten HeLa-Zellen wurde außerdem untersucht, ob die Stimulation der Zellen mit poly(IC) und IFN α die Expression der Reporterplasmide induzieren kann (Abb. 2.23). Anstatt der vermuteten gesteigerten Expression nach poly(IC)-Behandlung, wurde beim aktiven Promotorkonstrukt pCAT-1 überraschenderweise eine um etwa 20% geringere Expression des Reportergens im ELISA gemessen. Da potentielle Bindungsstellen für dsRNA-induzierte Transkriptionsfaktoren im Promotor vorhanden sind (s. S. 30, Abb. 2.21), ist der Grund für die reduzierte Expression unklar. Möglicherweise ließe sich eine Induktion mit einem längeren Promotorabschnitt (>1,5kb) zeigen.

Durch die Behandlung der Zellen mit IFN α kam es hingegen wie erwartet zu einer Induktion der Expression um 15–20%, so wie es auch bei endogenem PI31 in der RT-PCR und im Westernblot beobachtet wurde (s. S. 28, Abb. 2.18A). Ob diese Induktion durch den Transkriptionsfaktor IRF-1 vermittelt wird (s. S. 30, Abb. 2.21), muß allerdings noch durch Mutation der entsprechenden Bindungssequenz im Promotor ermittelt werden. Bei

allen anderen untersuchten Reportergenplasmiden ließ sich, aufgrund der extrem geringen Basalexpression, kein eindeutiger Effekt durch die poly(IC)- oder IFN α -Behandlung nachweisen (Abb. 2.23).

Die Expression der Reportergenplasmide in unbehandelten und poly(IC)/IFN α -stimulierten Zellen wurde zusätzlich mittels CAT-spezifischer Primer in der RT-PCR überprüft (Abbildung 2.24). Die relative Menge der detektierten PCR-Produkte korrelierte dabei wei-

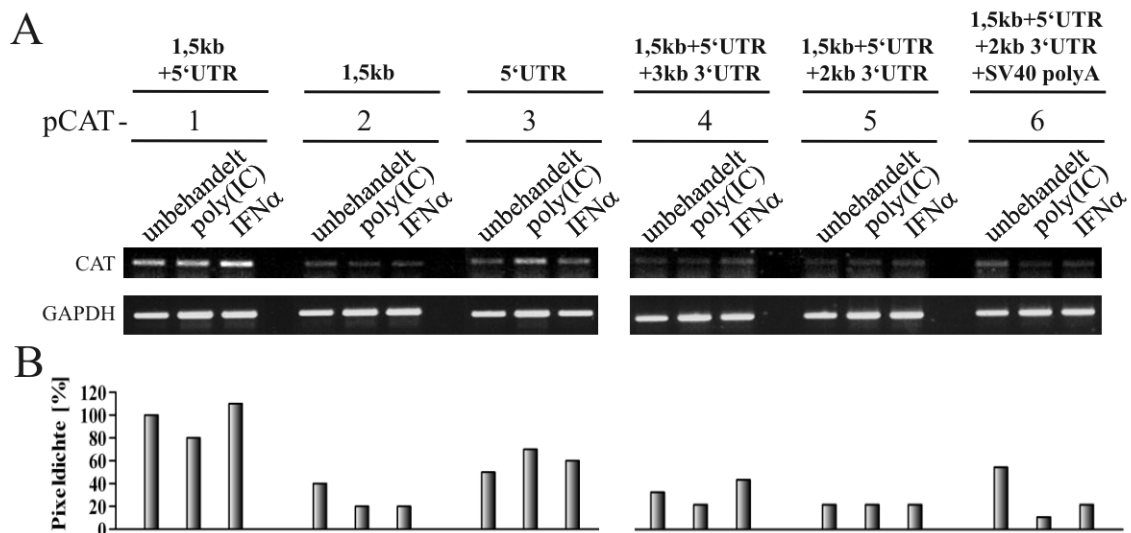


Abbildung 2.24: Analyse der CAT-Reporterexpression auf RNA-Ebene. HeLa-Zellen wurden wie in Abb. 2.23 beschrieben transfiziert und stimuliert. **(A)** RT-PCR mit CAT-spezifischen Primern, **(B)** densitometrische Auswertung der CAT-Signale, die Werte wurden mit GAPDH abgeglichen und pCAT-1 „unbehandelt“ gleich 100% gesetzt. Die Auswertung zeigte, daß die mRNA-Expression des pCAT-1 Konstruktes im Vergleich zu den anderen am stärksten war, und daß die Expression auf RNA-Ebene der auf Proteinebene ähnelt.

testgehend mit den Ergebnissen des CAT-ELISA. Eine Ausnahme bildete jedoch das Konstrukt pCAT-3, das nur die 5'UTR beinhaltet. Dessen Transkription war deutlich höher als dessen Translation.

HeLa-Zellen wurden außerdem mit den Reportergenplasmiden und dem dsRNA-Rezeptor TLR3 für 16h kotransfiziert und ebenfalls mit poly(IC) und IFN α stimuliert. Die Ergebnisse des CAT-ELISA glichen jedoch den Ergebnissen mit nicht TLR3-transfizierten Zellen. Es wurde wieder eine verringerte Expression des Reportergens nach poly(IC)-Stimulation festgestellt (Daten nicht gezeigt).

Aus den vorangegangenen Studien zur Regulation von PI31 läßt sich zusammenfassend schließen, daß die gesteigerte Expression von PI31 nach poly(IC)-Stimulation erstens nicht durch TLR3 vermittelt wird und zweitens nicht mit dem untersuchten Promotorabschnitt in Zusammenhang steht. Die Induktion durch IFN α beruht möglicherweise auf der Funktionalität der IRF-1 Bindungsstelle im Promotor, die allerdings noch bestätigt werden muß.

Des weiteren konnte gezeigt werden, daß sich die untranslatierte 3'-Region der PI31-mRNA unter den gewählten Bedingungen inhibitorisch auf die Expression auswirkt, womit sich die vermutete regulatorische Funktion der 3'UTR bestätigt.

2.4 Interaktionen und Funktion

2.4.1 Interaktionen von PI31

Gereinigtes PI31 ist in der Lage, ein Homodimer mit einer Größe von ungefähr 60kDa zu bilden (Ma et al., 1992). Um die Komplexbildung von PI31 in humanen Zellen zu überprüfen, wurden Vernetzungsexperimente mit dem zellmembrangängigen Vernetzer DSP⁶ durchgeführt. Dazu wurden HeLa-Zellen mit DSP in der Endkonzentration 100µM für eine halbe Stunde inkubiert und anschließend etwa 4mg Gesamtlysat in einem Saccharosedichtegradienten ultrazentrifugiert. Die Analyse der vernetzten Proteine in den einzelnen Fraktionen erfolgte im Westernblot mit dem PI31-spezifischen Antikörper αC-PI31. Es zeigte sich, daß PI31 hauptsächlich als ein Proteinkomplex von ca. 60kDa in den niedermolekularen Fraktionen 16–18 auftritt. In den gleichen Fraktionen konnte dagegen freies PI31 nur in geringen Mengen detektiert werden (Abbildung 2.25A).

Alle Fraktionen wurden daraufhin mit DTT behandelt, um den Vernetzer wieder zu spalten. Die Analyse im Westernblot ergab jedoch keine Veränderung im Migrationsverhalten von PI31 (Abbildung 2.25A). Das deutet darauf hin, daß PI31 *in vivo* unter den gewählten Bedingungen nicht mit größeren Komplexen, wie z. B. dem Proteasom, interagiert. Um zu testen, ob die Überexpression von PI31 mit anschließender Vernetzung ein verändertes Migrationsverhalten im Dichtegradienten hervorruft, wurden HeLa-Zellen für 16h mit myc-markiertem PI31 (mycV1) transfiziert und mit 100µM DSP behandelt. Die Überexpression sowie die N-terminale Markierung mit dem myc-Epitop beeinflussten jedoch nicht das Migrationsverhalten und die Komplexbildung von mycV1. Es konnte wie endogenes PI31 in den niedermolekularen Fraktionen 16–18 hauptsächlich als ca. 60kDa großer Komplex nachgewiesen werden (Abbildung 2.25B).

Der prolinreiche C-Terminus von PI31 ist zwischen den verschiedensten Spezies konserviert und beinhaltet potentielle Erkennungsmotive, die von anderen Proteinen gebunden werden können (siehe S. 20, Abb. 2.9). Als ein PI31-interagierendes Protein wurde CD2BP2 identifiziert, dessen GYF-Domäne prolinreiche Motive im C-Terminus von PI31 *in vitro* binden kann (Kofler et al., 2005a). Um die mögliche Interaktion von PI31 mit CD2BP2 *in vivo* zu untersuchen, wurden Koimmunpräzipitationen des myc-markierten PI31 mit

⁶Dithiobis(succinimidylpropionat)

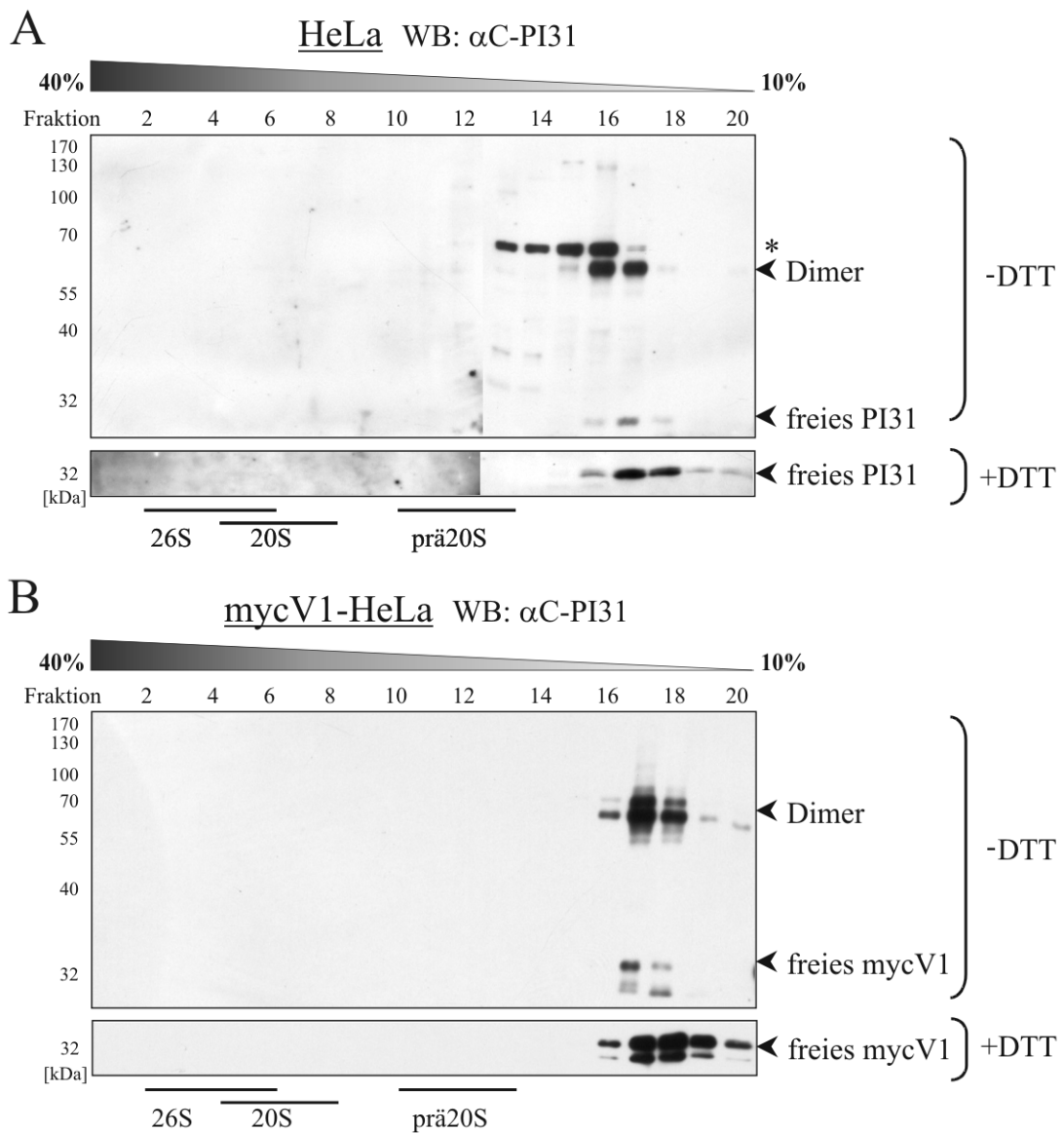


Abbildung 2.25: Saccharosedichtegradienten mit vernetzten Proteinen (-DTT) und wieder gespaltenem Vernetzer (+DTT). **(A)** HeLa-Zellen wurden mit $100\mu\text{M}$ DSP-Vernetzer für 30min inkubiert und die Lysate im Dichtegradienten ultrazentrifugiert. Die Detektion von endogenem PI31 in den Fraktionen im Westernblot erfolgte mit dem AK α C-PI31. Der Stern markiert eine Kreuzreaktion, die aufgrund langer Belichtungszeit auftritt und auch im Westernblot +DTT bei diesem Molekulargewicht zu sehen ist. **(B)** HeLa-Zellen wurden vor der Vernetzung für 16h mit dem mycV1 Expressionsplasmid transfiziert. Die Detektion von mycV1 erfolgte mit dem AK α C-PI31, die Doppelbande resultiert aus der gleichzeitigen Detektion von endogenem PI31. Die ungefähre Position des 26S-, 20S- sowie prä20S-Proteasoms im Dichtegradienten wurde bei (A) und (B) jeweils dargestellt. Das endogene PI31 als auch das überexprimierte mycV1-Protein sind in Lysaten mit vernetzten Proteinen hauptsächlich als Dimere in den niedermolekularen Fraktionen 16–18 vertreten. Nach Spaltung des Vernetzers kommt es nicht zu einer Verlagerung in Fraktionen höherer Dichte.

EGFP-markiertem CD2BP2 durchgeführt. Aufgrund des zu PI31 identischen C-Terminus von V5 (s. S. 20, Abb. 2.9), wurde diese PI31-Isoform in die Untersuchungen mit einbezogen (Abbildung 2.26). Unter den gewählten Bedingungen konnte jedoch weder eine Interaktion

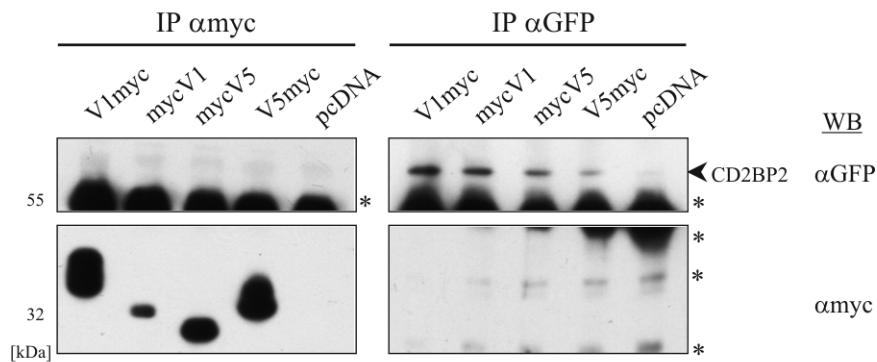


Abbildung 2.26: Immunpräzipitationen von myc-markiertem V1 und V5 sowie EGFP-markiertem CD2BP2 zur Überprüfung einer möglichen Interaktion. HeLa-Zellen wurden für 16h mit den entsprechenden Expressionsplasmiden von V1 und pEGFP-CD2BP2 oder von V5 und pEGFP-CD2BP2 kotransfiziert. Als Negativkontrolle diente die Kotransfektion von pEGFP-CD2BP2 mit dem Leervektor pcDNA3.1. Die Immunpräzipitation von V1 und V5 erfolgte mit einem α myc-Antikörper sowie von EGFP-CD2BP2 mit einem α GFP-Antikörper. Die Ansätze wurden jeweils mit den gleichen Antikörpern im Westernblot überprüft; die Sterne markieren die schwere und leichte AK-Kette sowie Kreuzreaktionen. Es konnte unter den gewählten Bedingungen keine Interaktion von V1 oder V5 mit CD2BP2 festgestellt werden.

zwischen PI31 und CD2BP2 noch zwischen V5 und CD2BP2 festgestellt werden. Möglicherweise bedarf es für eine Interaktion anderer experimenteller Bedingungen oder eines Stimulus.

Um potentielle Interaktionspartner von PI31 zu identifizieren, wurden weiterhin Immunpräzipitationen aus Dichtegradientenfraktionen durchgeführt. HeLa-Zellen wurden für 16h mit mycV1 und V1myc transfiziert und jeweils 4mg Gesamtzelllysate im Saccharosegradienten ultrazentrifugiert. Die Präzipitation der myc-markierten Proteine erfolgte mit einem α myc-Antikörper aus zwei vereinigten Fraktionen von je 500 μ l. Das Vorhandensein von PI31 in den Präzipitaten wurde daraufhin im Westernblot überprüft (Abbildung 2.27A). Die Ansätze, in denen myc-markiertes PI31 detektiert werden konnte, wurden vereinigt, in einem denaturierenden Gradientengel (5–15%) aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Aus Abbildung 2.27B geht hervor, daß mit mycV1 mehr Proteine präzipitiert werden konnten als mit V1myc. Möglicherweise behinderte die C-terminale Markierung die Interaktion von PI31 mit anderen Proteinen. Die markierten Banden des mycV1-Ansatzes wurden ausgeschnitten und in die massenspektrometrische Analyse gegeben. Das Ergebnis der Analyse ist in Tabelle 2.2 zusammengestellt. Die Signifikanz der gefundenen potentiellen Interaktionen muß jedoch noch überprüft werden, da die Wiederholung des Experiments aufgrund zu geringer Proteinmengen kein Ergebnis brachte.

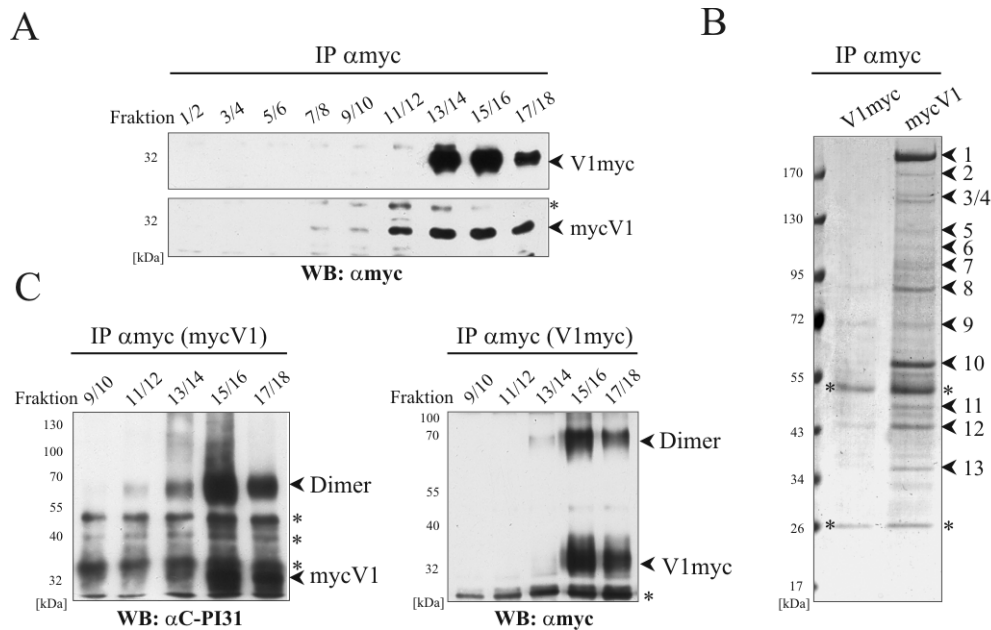


Abbildung 2.27: Immunpräzipitationen aus vereinigten Saccharosedichtegradientenfractionen. **(A)** Nach der Ultrazentrifugation von HeLa-Lysaten mit überexprimiertem mycV1 bzw. V1myc erfolgte die Präzipitation mit einem α myc-AK aus den angegebenen Fractionen. Die Präzipitate wurden im Westernblot mit dem α myc-AK auf das Vorhandensein der myc-markierten Proteine getestet. **(B)** Die vereinigten Präzipitate 13–18 (V1myc) und 11–18 (mycV1) aus (A) wurden im 5–15%igen Gradientengel aufgetrennt und das SDS-Gel mit Coomassie gefärbt. Die nummerierten Banden bei mycV1 wurden ausgeschnitten und analysiert. **(C)** Mit mycV1 und V1myc transfizierten HeLa-Zellen wurden mit $100\mu\text{M}$ DSP behandelt und die vernetzten Proteine im Dichtegradienten ultrazentrifugiert. Die Präzipitation erfolgte mit dem α myc-AK aus den angegebenen Fractionen. Im Westernblot wurde mycV1 mit dem α C-PI31-Antikörper und V1myc mit dem α myc-Antikörper detektiert. Die Sterne markieren in allen Abbildungen schwere/leichte AK-Kette und Kreuzreaktionen.

Es wurde ebenso versucht, aus Gradientenfractionen von DSP-vernetzten Proben Komplexe von mycV1 und V1myc zu präzipitieren. Es ließen sich im Westernblot zumindest die Dimere sowie freies myc-markiertes PI31 detektieren (Abbildung 2.27C). Die Analyse der Präzipitate mittels Massenspektrometrie war jedoch aufgrund zu geringer Proteinmengen nicht auswertbar.

2.4.2 PI31 und das Immunoproteasom

PI31 hat in Mauszellen einen negativen Einfluß auf die Reifung des Immunoproteasoms, bei der es zu einer verzögerten Prozessierung der Immununtereinheiten kommt (Zaiß et al., 2002). Dieser Effekt sollte deshalb auch in humanen Zellen untersucht werden, wobei neben PI31 auch die Isoformen V2, V3 und V5 mit einbezogen wurden.

HeLa-Zellen wurden dazu mit den Expressionsplasmiden von PI31, V2, V3 und V5 für 16h transfiziert und für weitere 24h mit $\text{IFN}\gamma$ stimuliert. Nach der Dichtegradientenultrazentrifugation von jeweils 4mg Gesamtzelllysate, erfolgte die Analyse der Fractionen im

Bande	identifiziertes Protein	Sequenzabdeckung
1	Myosin	43%
2	Myosin/IQGAP1	32%/28%
3/4	Myosin/Carbamoylphosphatsynthase	34%/33%
5	Myosin/Carbamoylphosphatsynthase	32%/24%
6	Importin beta-3 (RanBP5)	22%
7	Exportin 2 (CAS/CSE1L)	25%
8	HSP 90-beta/alpha	39%/40%
9	Stress-70 protein (GRP75)	32%
10	Hsp60	65%
11	eEF-1-alpha-1/2	22%/17%
12	Aktin	55%
13	GAPDH	37%

Tabelle 2.2: Ergebnis der Massenspektrometrieanalyse mit identifizierten potentiellen Interaktionspartnern von N-terminal myc-markiertem PI31.

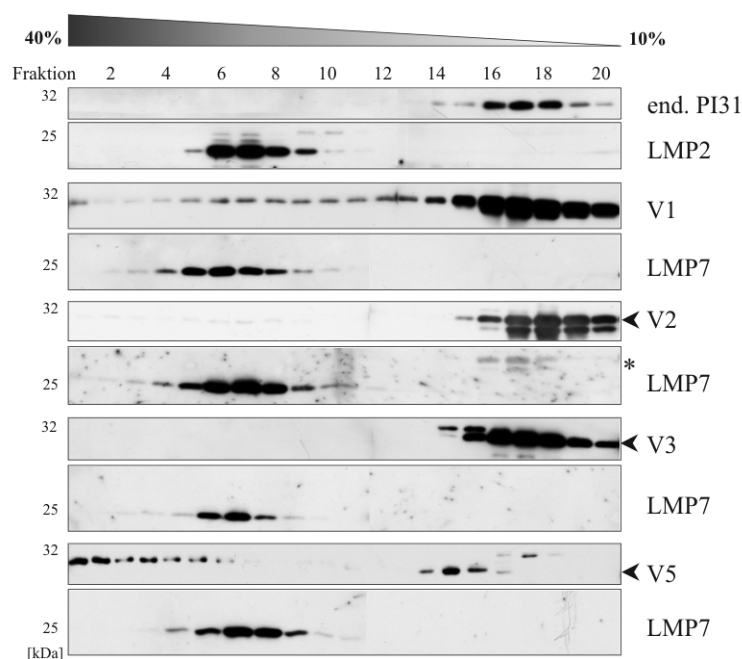


Abbildung 2.28: Saccharosedichtegradienten von Lysaten untransfizierter sowie transfizierter HeLa-Zellen zur Überprüfung der Modulatorfunktion von PI31. Die Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden von PI31 (V1), V2, V3 und V5 für 16h transfiziert und anschließend für weitere 24h mit 100U/ml IFN γ stimuliert. Die Gradientenfractionen wurden mit den PI31-spezifischen Antikörpern α C-PI31 (endogenes PI31, V1, V5) und α N-PI31 (V2, V3) im Westernblot getestet. Die Detektion von V1 in den hochmolekularen Fractionen 1–12 resultiert aus der massiven Überexpression (vergleiche S. 24, Abb. 2.14). Eine mögliche Akkumulation der Proform der Immunountereinheit LMP7 in transfizierten (V1, V2, V3, V5) bzw. LMP2 in untransfizierten Zellen (end. PI31) wurde mit spezifischen Antikörpern gegen LMP7 u. LMP2 überprüft. Der Stern markiert die nicht vollständig entfernten Signale des vorherigen Tests. Es konnte keine Akkumulation der LMP7 Proform durch die Überexpression der PI31-Isoformen festgestellt werden.

Westernblot (Abbildung 2.28). Es konnte jedoch nach Überexpression von PI31 und der PI31-Isoformen keine Akkumulation der Proform der Immunounterheit LMP7 (preLMP7) beobachtet werden.

In einem ähnlichen Experiment wurden nur V1 und V5 in HeLa-Zellen überexprimiert und nach 24h IFN γ -Stimulation die Gesamtzelllysate im Westernblot analysiert (Abbildung 2.29A). Auch in diesem Versuch kam es zu keiner Akkumulation von preLMP7 durch die Überexpression von V1 und V5.

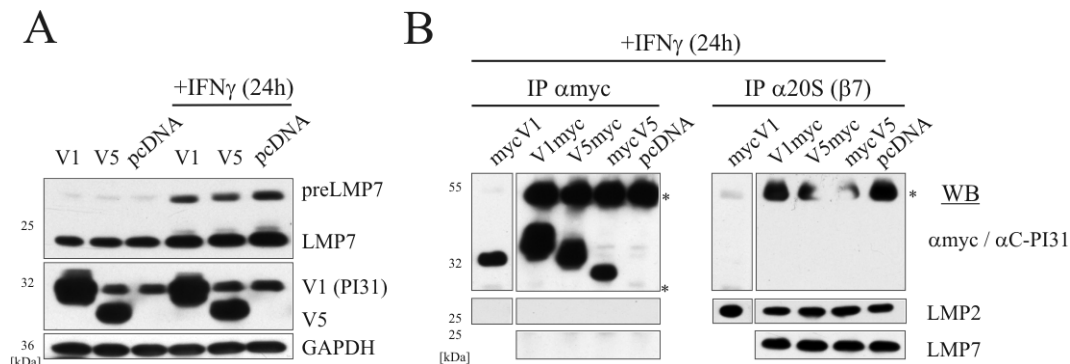


Abbildung 2.29: (A) Einfluß von PI31 (V1) und V5 auf die Reifung von LMP7. HeLa-Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden von PI31 und V5 für 16h transfiziert und daraufhin für 24h mit 100U/ml IFN γ stimuliert. Im Westernblot erfolgte die Detektion von V1 und V5 mit dem Antikörper α C-PI31 und von LMP7 mit einem LMP7-spezifischen Antikörper. (B) Immunpräzipitation der myc-markierten Proteine V1 bzw. V5 und des 20S Proteasoms. HeLa-Zellen wurden mit myc-markiertem PI31 bzw. V5 für 16h transfiziert und für weitere 24h mit 100U/ml IFN γ stimuliert. Die Präzipitationen aus Gesamtzelllysate erfolgten mit einem α myc-Antikörper bzw. einem α 20S (β 7)-Antikörper. mycV1 wurde mit dem α C-PI31-AK im Westernblot detektiert, V1myc, V5myc und mycV5 mit dem α myc-AK. LMP2 und LMP7 wurden mit jeweils spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Es konnte jedoch keine Interaktion von PI31 bzw. V5 mit dem Immunoproteasom festgestellt werden. Die Sterne markieren die schwere/leichte AK-Kette.

Eine mögliche Assoziation von PI31 bzw. V5 mit dem Immunoproteasom sollte mittels Immunpräzipitation der myc-markierten Proteine PI31 und V5 überprüft werden. Die Immunpräzipitation wurde sowohl mit einem α myc-Antikörper als auch mit einem Antikörper gegen das Proteasom durchgeführt und beide Ansätze im Westernblot auf das jeweilige Vorhandensein von PI31 bzw. V5 und proteasomaler Immununtereinheiten untersucht (Abbildung 2.29B). Die myc-markierten Proteine sowie das Immunoproteasom konnten präzipitiert werden, jedoch wurde keine Interaktion zwischen 20S und V1 bzw. V5 beobachtet. Ein verminderter Einbau der reifen Immununtereinheiten in das Proteasom wurde ebenfalls nicht detektiert. Aufgrund dieser Daten ist es fraglich, ob PI31 im humanen System als Modulator des Immunoproteasoms fungiert, so wie es im murinen System von Zaiß et al. (2002) beobachtet wurde.

2.4.3 Einfluß der Isoformen von PI31 auf das Proteasom

PI31 wurde als ein potenter Inhibitor des Proteasoms *in vitro* charakterisiert und die inhibitorisch wirksame Region auf den C-Terminus eingegrenzt (Ma et al., 1992; Zaiß et al., 1999; McCutchen-Maloney et al., 2000). Diese Funktion konnte jedoch *in vivo* bisher nicht bestätigt werden (Zaiß et al., 2002).

Um zu überprüfen, ob die Überexpression der potentiellen PI31-Spleißvarianten zu einer Veränderung der proteasomalen Aktivität führt, wurde diese mit Hilfe des *Proteasome-GloTM*-Assays (Promega) bestimmt. Hierfür wurden alle fünf klonierten Varianten einschließlich PI31 (V1–V5) in HeLa transfiziert und nach 16h die intrazelluläre Proteasomaktivität gemessen (Abbildung 2.30A).

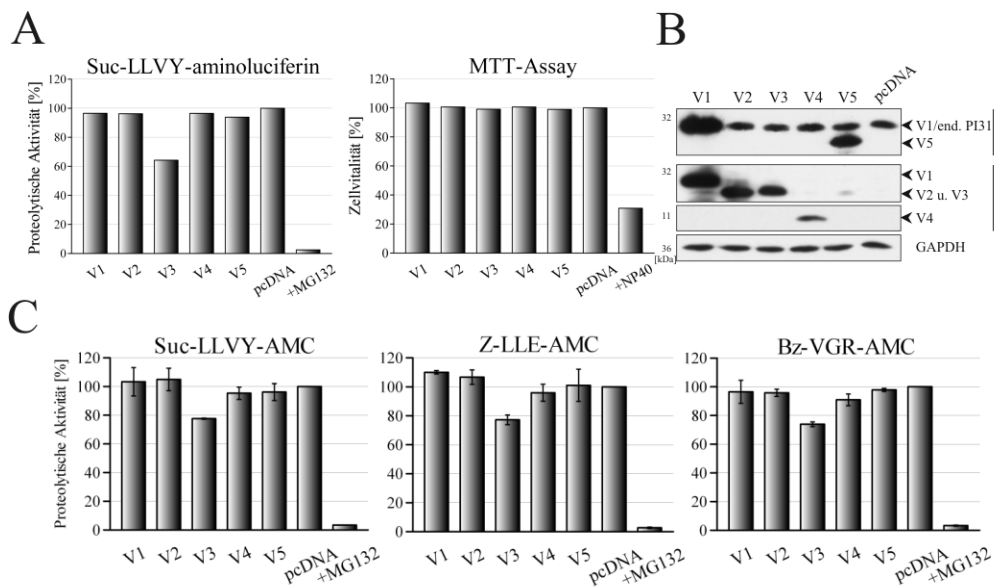


Abbildung 2.30: Einfluß von V3 auf die Proteasomaktivität. HeLa-Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden von PI31 und V2–V5 für 16h transfiziert. **(A)** *GloTM*-Assay (Promega) zur Messung der chymotrypsinähnlichen Proteasomaktivität in lebenden transfizierten HeLa-Zellen sowie MTT-Assay zur Überprüfung der Zellvitalität. **(B)** Kontrolle der Überexpression der Isoformen von PI31 im Westernblot. **(C)** Aktivitätstest mit Lysaten von transfizierten HeLa-Zellen. MG132 wurden bei allen Aktivitätsbestimmungen mit einer Konzentration von 10 μ M im Substratansatz eingesetzt. Die Überexpression von V3 führt zur Inhibition der drei katalytischen Aktivitäten des Proteasoms.

Überraschenderweise führte die Überexpression von V3 zu einer bis zu 40%igen Inhibition der chymotrypsinähnlichen Aktivität des Proteasoms, während die anderen Varianten keine oder nur marginale Wirkung zeigten. Die Möglichkeit, daß die durch Überexpression von V3 reduzierte proteolytischen Aktivität auf eine Abnahme der Zellvitalität zurückzuführen sei, konnte mit der Durchführung eines MTT-Assays ausgeschlossen werden (Abbildung 2.30A). Die fünf Transfektanten unterschieden sich in ihrer Zellproliferation nicht von der Vektorkontrolle.

Zur Überprüfung des Effekts wurden Aktivitätstests mit Lysaten V1–V5 transfizierter HeLa-Zellen durchgeführt. Die erfolgreiche Überexpression der Varianten wurde vorher mittels Westernblot kontrolliert (Abbildung 2.30B). Die Messung der proteasomalen Aktivität in Lysaten bestätigte die Inhibition durch V3 und zeigte zudem, daß alle drei proteolytischen Aktivitäten des Proteasoms betroffen waren (Abbildung 2.30C).

2.4.4 Wirkung auf *in vivo* Substrate des Proteasoms

Da die vorangegangenen Aktivitätstests mit fluorogenen Peptidsubstraten durchgeführt wurden, sollte nun geprüft werden, ob die Isoform V3 auch die Prozessierung natürlicher Substrate des Proteasoms beeinflusst. Aufgrund der möglichen Lokalisierung von V3 am ER (siehe Abschnitt 2.2.2), stellte sich die Frage, ob V3 eine Wirkung auf die ER-assoziierte Proteindegradation (ERAD) haben könnte. Um das zu überprüfen, wurden die Proteine CD3 δ und HERPUD-1 untersucht. Mit CD3 δ transfizierte Zellen werden häufig bei Untersuchungen zu ERAD genutzt, da dieses ERAD-Substrat vom Proteasom abgebaut wird und eine Halbwertszeit von ca. 4h hat (Yang et al., 1998). HERPUD-1 ist eine Komponente des ERAD und ebenfalls ein Substrat des Proteasoms mit kurzer Halbwertszeit (Sai et al., 2003; Schulze et al., 2005).

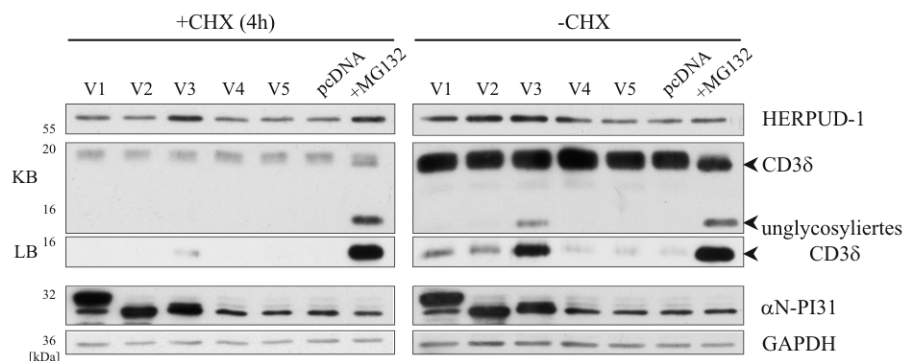


Abbildung 2.31: Einfluß von V3 auf endogene Substrate des Proteasoms. CD3 δ -Zellen wurden mit V1–V5 für 16h transfiziert und anschließend mit 50 μ g/ml Cycloheximid (CHX) für 4h (+CHX) behandelt, MG132 (10 μ M) wurde 4h vor der Ernte zu den Zellen gegeben. Westernblot gegen HERPUD-1 und CD3 δ (KB = kurze Belichtung), die unglycosylierte Form wurde zusätzlich in einer längeren Belichtung (LB) dargestellt. Die Überexpression von V3 führte zur Akkumulation von HERPUD-1 und der unglycosylierten Form von CD3 δ .

Mit CD3 δ stabil transfizierte HeLa-Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden von V1 bis V5 für 16h transient transfiziert und 4h vor der Ernte mit 50 μ g/ml des Translationsinhibitors Cycloheximid (CHX) behandelt. Wie in Abbildung 2.31 zu sehen ist, war ausschließlich nach Transfektion mit V3 das unglycosylierte CD3 δ detektierbar (-CHX, kurze Belichtung). Dies ähnelt der MG132-Inhibitorkontrolle und spricht für eine Inhibition des Proteasoms durch V3. Nach langer Belichtung des Films war zusätzlich bei V1 und

V2 eine leicht erhöhte Menge des unglycosylierten CD3 δ detektierbar, wobei jedoch nach 4h CHX-Behandlung nur noch bei V3 die unglycosylierte Form auftrat.

In den Ansätzen ohne Translationsinhibitor ist eine erhöhte Proteinmenge von HERPUD-1 bei V1–V4 zu sehen, jedoch ist auch die Menge der Ladekontrolle GAPDH in diesen Ansätzen leicht erhöht. Nach Behandlung mit CHX wurde deutlich, daß nur bei V3 eine Akkumulation, möglicherweise auch Aufregulation von HERPUD-1 auftritt. Die Menge an HERPUD-1 ist vergleichbar mit der in der MG132-Inhibitorkontrolle, was auf einen verzögerten Abbau durch das Proteasom hindeutet.

2.4.5 Abbaukinetiken endogener Substrate nach V3-Transfektion

Um zu prüfen, wie sich die Stabilität von CD3 δ und HERPUD-1 mit der Zeit ändert, wurde deren Abbaukinetik in V1 und V3 transfizierten CD3 δ -HeLa durch Behandlung mit CHX untersucht (Abbildung 2.32). Im Vergleich zu V1 und der Vektorkontrolle wird nach Überexpression von V3 deutlich mehr und länger unglycosyliertes CD3 δ detektiert (über 400% im unbehandelten Ansatz). Der gleiche Effekt war bei HERPUD-1 mit einer 50%igen Steigerung der Proteinmenge zu beobachten. Ebenfalls führte die Überexpression von V1 zu einer Steigerung der Menge an HERPUD-1 im Vergleich zur Vektorkontrolle, wohingegen die Menge des unglycosylierten CD3 δ nur geringfügig zunahm. Trotz der gesteigerten

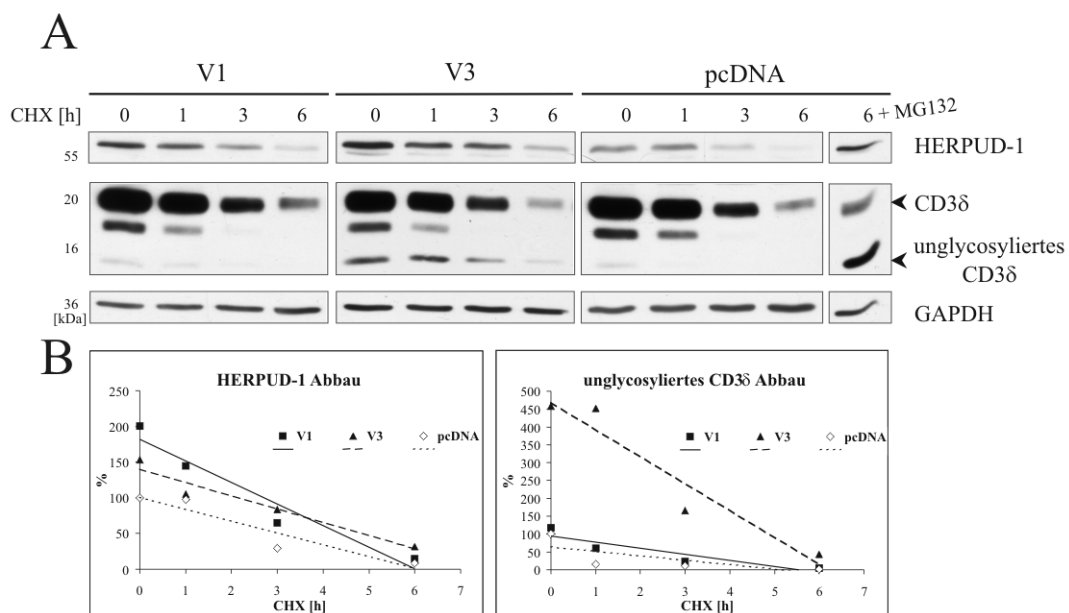


Abbildung 2.32: Abbaukinetiken der proteasomalen Substrate HERPUD-1 und CD3 δ . CD3 δ -HeLa wurden für 16h mit V1, V3 und dem pcDNA-Leervektor transfiziert und anschließend für 0–6h mit 50 μ g/ml CHX behandelt. **(A)** Westernblot gegen HERPUD-1, CD3 δ und GAPDH, **(B)** densitometrische Auswertung der HERPUD-1 und CD3 δ -Signale, die Werte wurden mit GAPDH abgeglichen und der Nullstunden-Wert der Kontrolle gleich 100% gesetzt. Durch Überexpression von V3 verlängert sich deutlich die Halbwertszeit von HERPUD-1 und CD3 δ , was auf eine verzögerte Degradation hindeutet.

Menge an HERPUD-1 nach Überexpression von V1 war die Halbwertszeit des Substrates mit etwa 3h in etwa gleich der Vektorkontrolle. Durch die Überexpression von V3 verlängerte sich hingegen die HERPUD-1 Halbwertszeit auf bis zu 4h. Für CD3 δ konnte durch die Überexpression von V1 und V3 eine erhöhte Halbwertszeit von 2h bzw. 3h im Vergleich zur Kontrolle mit etwa 1h festgestellt werden.

Die längeren Halbwertszeiten von HERPUD-1 und CD3 δ deuten daraufhin, daß durch die inhibitorische Wirkung von V3 auf das Proteasom auch der Abbau endogener Substrate verzögert wird.

Es wurden zusätzlich zwei weitere kurzlebige endogene Substrate des Proteasoms untersucht, zum einen der Transkriptionsfaktor Nrf2 und zum anderen p53 (Abbildung 2.33). Es zeigte sich, daß nach Überexpression von V3 der gleiche Effekt bei Nrf2 und p53 auftritt, wie bei CD3 δ und HERPUD-1. Das heißt, im Vergleich zur Kontrolle sind beide Proteine zu Beginn schon stärker vertreten, wodurch auch der Abbau verzögert erscheint. Durch die Überexpression von V1 konnte indes nur für p53 eine erhöhte Proteinmenge nachgewiesen werden. Der Verlauf des p53-Abbaus hatte bei allen Versuchsansätzen (V1, V3 und pcDNA) einen exponentiellen Charakter, wohingegen alle anderen untersuchten Proteinsubstrate einen annähernd linearen Abbau zeigten. Die Halbwertszeit von p53 erhöhte sich nach Überexpression von V1 und V3 um das Fünffache im Vergleich zur Vektorkontrolle. Für Nrf2 wurde dagegen nur bei Überexpression von V3 eine etwa anderthalbfach erhöhte Halbwertszeit ermittelt.

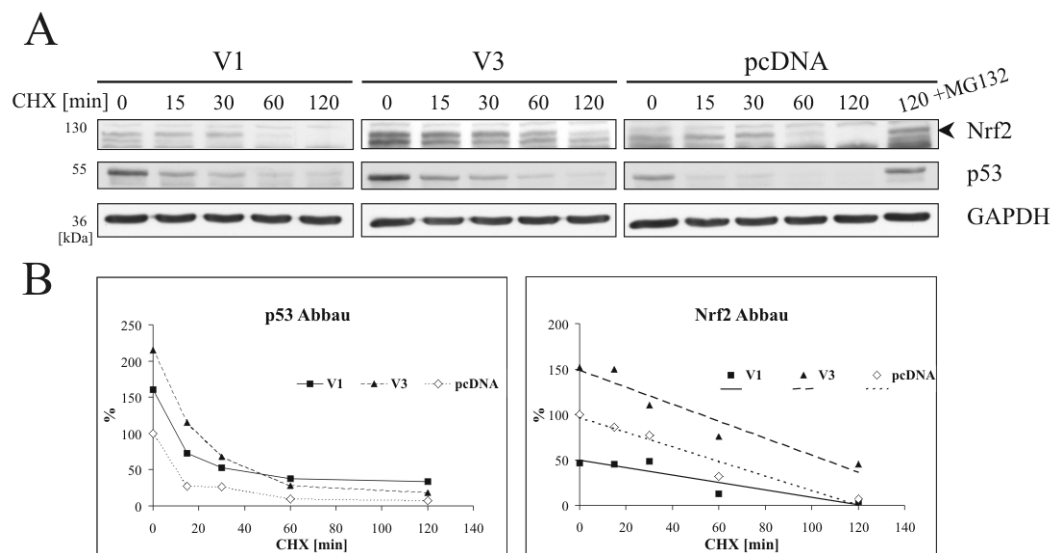


Abbildung 2.33: Abbaukinetiken der proteasomalen Substrate p53 und Nrf2. HeLa-Zellen wurden für 16h mit V1, V3 und dem pcDNA-Leervektor transfiziert und anschließend für 0–120min mit 50 μ g/ml CHX behandelt. **(A)** Westernblot gegen p53, Nrf2 und GAPDH, **(B)** densitometrische Auswertung der p53 und Nrf2-Signale, die Werte wurden mit GAPDH abgeglichen und der Nullstunden-Wert der Kontrolle gleich 100% gesetzt. Aufgrund des exponentiellen Verlaufes bei p53 wurde keine Trendlinie eingefügt. Die Überexpression von V3 führte ebenfalls zu einem verzögerten Abbau und einer verlängerten Halbwertszeit von p53 und Nrf2.

Bei allen vier untersuchten Proteinsubstraten konnte durch die Überexpression von V3 ein verzögerter Abbau und eine daraus resultierende verlängerte Halbwertszeit gezeigt werden. Ebenso wurde nach der Überexpression von V1 eine Akkumulation der proteasomalen Substrate HERPUD-1 und p53 beobachtet, was darauf hindeutet, daß V1 und V3 die Funktion des Ubiquitin-Proteasom-Systems beeinflussen.

Von HERPUD-1 ist bekannt, daß es u. a. durch ER-Streß auf RNA- und Proteinebene stark induziert wird (van Laar et al., 2000; Kokame et al., 2000). Der Transkriptionsfaktor Nrf2 wird durch oxidativen Streß der auch durch ER-Streß entsteht, aktiviert und dessen Expression induziert (Kwak et al., 2001; Cullinan et al., 2003; Purdom-Dickinson et al., 2007). Aus diesem Grund sollte getestet werden, ob V3 ER-Streß auslösen kann und/oder die

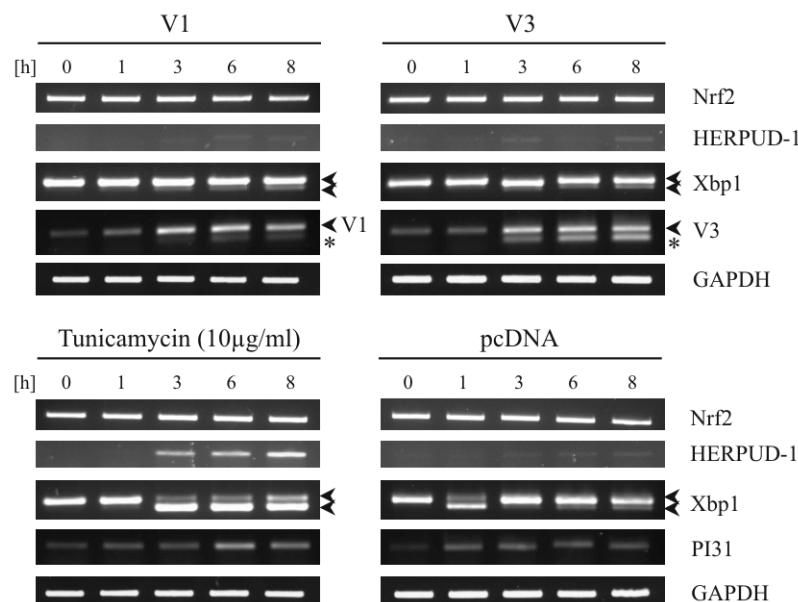


Abbildung 2.34: RT-PCR zur Überprüfung, ob die zeitliche Überexpression von V1 und V3 ER-Streß auslöst und die Expression von HERPUD-1 sowie Nrf2 auf RNA-Ebene induziert. HeLa-Zellen wurden für 0–8h mit V1, V3 und dem pcDNA-Leervektor transfiziert oder mit 10 µg/ml Tunicamycin behandelt. Die RT-PCR gegen Xbp1 diene als Marker für ER-Streß, dabei markieren Pfeile die ungespleißte und gespleißte (unten) cDNA von Xbp1. Der Stern bei V1 und V3 kennzeichnet eine infolge der Überexpression auftretende zusätzliche Bande (siehe Kapitel 2.4.6), der Pfeil zeigt jeweils die überexprimierte cDNA. Die Überexpression von V1 und V3 löste im Vergleich zu Tunicamycin keinen ER-Streß und keine Induktion von HERPUD-1 u. Nrf2 aus.

Transkription von HERPUD-1 und Nrf2 induziert. Dazu wurden HeLa-Zellen mit den Isoformen V1 und V3 transfiziert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten Proben genommen. Die Überexpression war bereits nach drei Stunden auf RNA-Ebene zu beobachten. Als Kontrolle diente eine Zeitreihe mit Tunicamycin zur Induktion von ER-Streß (Abbildung 2.34). Das Spleißen der mRNA von Xbp1 gilt als Marker für induzierten ER-Streß, dabei werden 26 Basen entfernt (Calfon et al., 2002). Die entstehende RNA kann als zunehmende kleinere

Bande im Agarosegel detektiert werden. Im Vergleich zur Tunicamycin-Kontrolle, bei der dieser Spleißvorgang deutlich induziert ist, hat die Überexpression von V1 und V3 jedoch keinen Einfluß auf die mRNA von Xbp1. Die beobachtete leichte Zunahme des Spleißprodukts ist auf den Transfektionsvorgang an sich zurückzuführen, wie die Vektorkontrolle zeigt. Es konnte ebenso keine Wirkung von V1 und V3 auf die Expression von HERPUD-1 und Nrf2 festgestellt werden (Abb. 2.34).

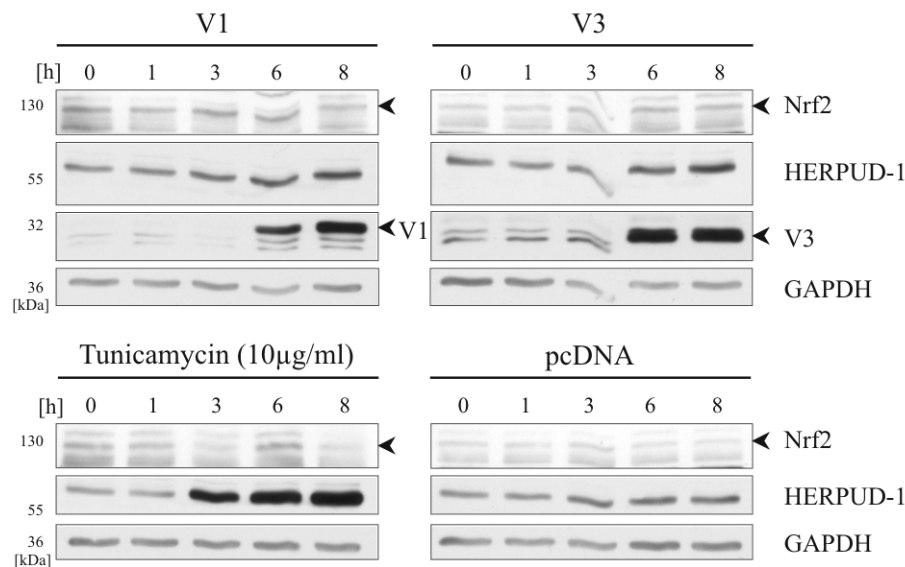


Abbildung 2.35: Westernblot zur Überprüfung, ob die zeitliche Überexpression von V1 und V3 die Expression von HERPUD-1 sowie Nrf2 auf Proteinebene induziert. HeLa-Zellen wurden für 0–8h mit V1, V3 und dem pcDNA-Leervektor transfiziert oder mit 10 µg/ml Tunicamycin behandelt. Gesamtzelllysate wurden im Westernblot mit spezifischen Antikörpern gegen HERPUD-1 und Nrf2 getestet sowie die Überexpression von V1 und V3 mit dem Antikörper α N-PI31 nachgewiesen. Der Pfeil bei Nrf2 zeigt das beobachtete Nrf2-Signal. Die Überexpression von V3 führte zur Akkumulation von HERPUD-1 sowie Nrf2. Durch V1 kam es ebenfalls zu einer Akkumulation von HERPUD-1.

Aus diesen Ergebnissen läßt sich schließen, daß der beobachtete Effekt von V3 auf den Proteingehalt von HERPUD-1 und Nrf2 weder auf die Induktion von ER-Streß noch auf eine verstärkte Transkription zurückzuführen ist.

Im Westernblot (Abbildung 2.35) ist zu erkennen, daß die überexprimierten Proteine V1 und V3 spätestens 6h nach Transfektion zu detektieren sind. Dabei wird deutlich, daß infolge der Überexpression von V3 die Proteinmenge von HERPUD-1 und Nrf2 mit der Zeit ansteigt. Die Überexpression von V1 führte ebenfalls zu einer Akkumulation von HERPUD-1, womit deutlich wird, daß die überexprimierten Proteine V1 und V3 den Abbau proteasomaler Substrate durch das UPS beeinträchtigen.

Mittels Koimmunpräzipitationen wurde außerdem untersucht, ob V3 direkt mit dem Proteasom interagiert. V1 und V3 wurden in HeLa-Zellen überexprimiert und die Koimmunpräzipitation mit den PI31-spezifischen Antikörpern α C-PI31 und α N-PI31 sowie mit

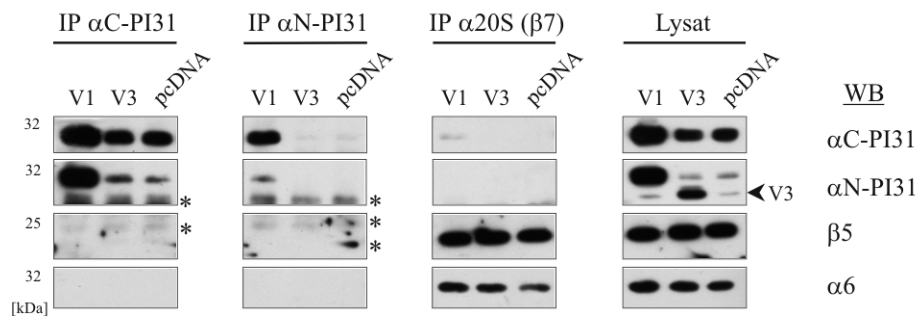


Abbildung 2.36: Immunpräzipitationen zum Test einer möglichen Interaktion von V1 und V3 mit dem Proteasom. HeLa-Zellen wurden mit V1, V3 und dem pcDNA-Leervektor für 16h transfiziert. Die Immunpräzipitation von V1 und V3 aus Gesamtzelllysaten erfolgte mit den PI31-spezifischen Antikörpern α C- und α N-PI31. Das Proteasom wurde mit einem anti- β 7 Antikörper präzipitiert. Die Präzipitate (IP) und die Lysate wurden im Westernblot (WB) mit den angegebenen Antikörpern getestet, der Pfeil markiert das überexprimierte V3 im Lysat, die Sterne zeigen Kreuzreaktionen und Antikörperketten an. Es konnte keine Interaktion von V1 bzw. V3 mit dem Proteasom beobachtet werden.

einem Proteasomantikörper gegen β 7 durchgeführt (Abbildung 2.36).

Die Immunpräzipitation zeigte, daß PI31 sehr gut durch α C-PI31 und nach Überexpression auch durch α N-PI31 präzipitiert werden kann. V3 ließ sich mit dem Antikörper α N-PI31 nicht präzipitieren, obwohl es im Lysat eindeutig detektiert wurde. Es konnte keine Assoziation von V3 mit dem Proteasom festgestellt werden, wie die Immunpräzipitation gegen das Proteasom zeigt. Im Falle von V1 wurde ein Signal detektiert, das aber im Vergleich zu der Menge an überexprimiertem Protein im Lysat extrem schwach war. Ob diese Interaktion von V1 mit dem Proteasom spezifisch ist, bleibt unklar, da in den Präzipitaten mit den PI31-spezifischen Antikörpern keinerlei Signal von proteasomalen Untereinheiten detektiert wurde. Ebenso konnte in dem Präzipitationsversuch in Abbildung 2.29B auf Seite 39 keine Interaktion zwischen PI31 und dem Proteasom festgestellt werden. Die fehlende Interaktion von V3 mit dem Proteasom deutet darauf hin, daß die Inhibition durch diese Isoform möglicherweise nicht durch direkten Kontakt ausgelöst wird und somit evtl. ein anderer Mechanismus zugrunde liegt.

2.4.6 Analyse der artifiziellen Spleißvariante

In Abbildung 2.34 auf Seite 44 war auffällig, daß mit der beginnenden Überexpression von V1 und V3 eine Doppelbande auftrat. Das zeitgleiche Erscheinen des etwa 200bp kleineren Signals ließ darauf schließen, daß es sich nicht um ein unspezifisches Produkt der RT-PCR handeln konnte, sondern im Zusammenhang mit der Überexpression stand. Das zusätzliche PCR-Produkt im V3-Ansatz wurde deshalb kloniert und sequenziert. Es bestätigte sich die Vermutung, daß es sich um ein Spleißprodukt der überexprimierten RNA von V3 handelte (Abb. 2.37A u. B).

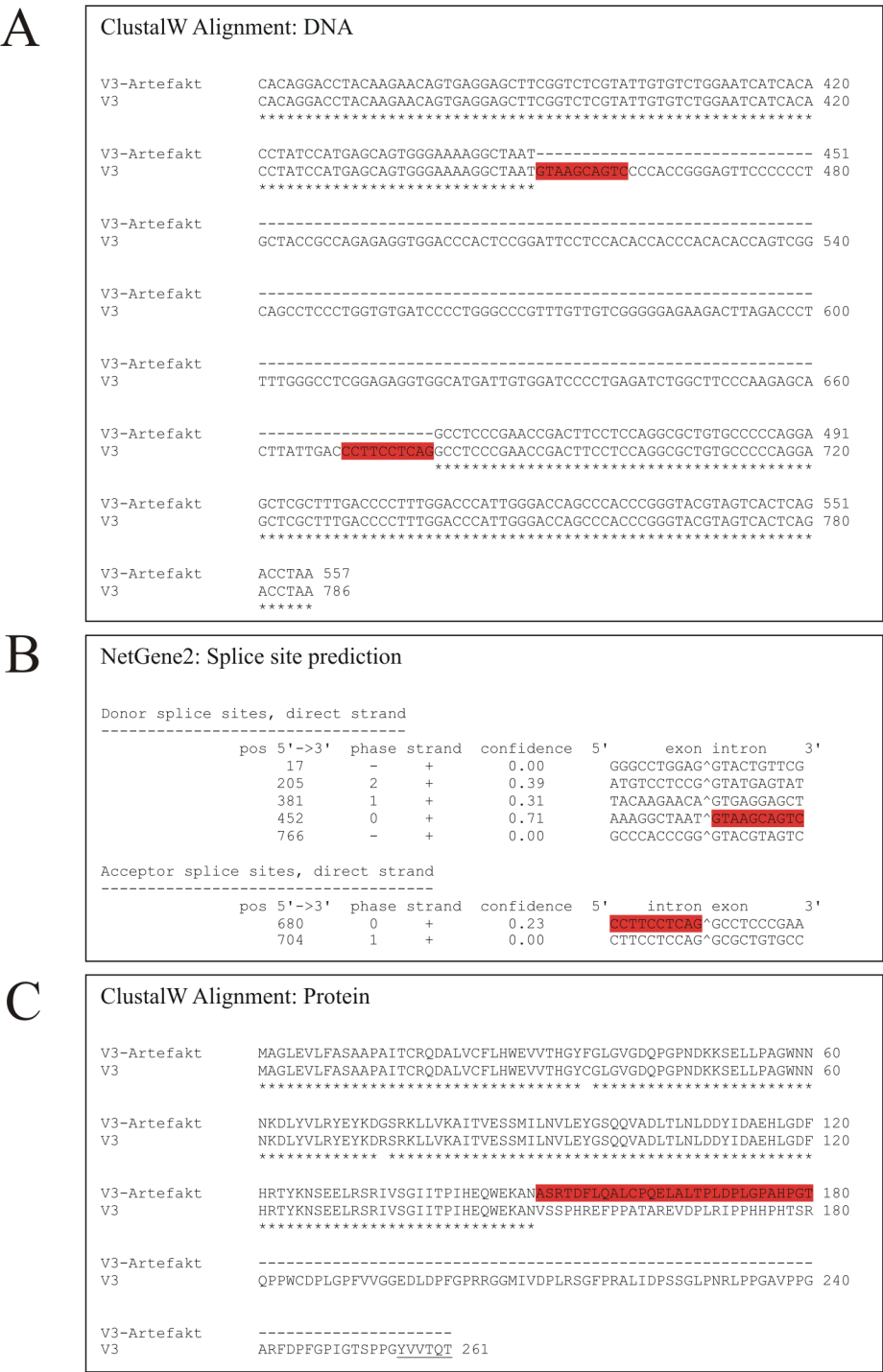


Abbildung 2.37: (A) DNA-Vergleich von V3 und dem sequenzierten V3-Spleißprodukt. (B) Vorhersage von Spleißstellen in der DNA-Sequenz von V3 mit dem Programm NetGene2, in (A) und (B) sind die übereinstimmenden Spleißstellen rot hervorgehoben. (C) Vergleich der jeweiligen Aminosäuresequenzen, rot hervorgehoben wurden die 30 „neuen“ Aminosäuren, unterstrichene AS zeigen den Unterschied zwischen V3 und PI31.

Es gibt bisher nur wenige Studien, die abnormale Spleißvorgänge bei der Überexpression von klonierter cDNAs beschreiben, wobei sich dieses Phänomen meist auf den verwendeten Expressionsvektor zurückführen ließ (Huang und Gorman, 1990). Durch die Nutzung von kryptischen Spleißstellen kann es zur Veränderung des Leserahmens und damit zur Expression modifizierter Proteine mit veränderten Eigenschaften kommen (Wise et al., 1989). Das aus dem V3-Spleißprodukt resultierende Protein unterschied sich von V3 in seiner Länge und in einem veränderten C-Terminus (Abbildung 2.37C). Der veränderten V3-Form fehlt der komplette prolinreiche C-Terminus und besitzt stattdessen eine Abfolge von 30 Aminosäuren, die keine Homologie zu bekannten Protein aufweist.

Um auszuschließen, daß die modifizierte Form anstelle von V3 den inhibitorischen Effekt auf das Proteasom und dessen Substrate ausübt, wurde die cDNA dieser artifiziellen Spleißvariante in den Expressionsvektor pcDNA3.1 kloniert und HeLa-Zellen damit für 16h transient transfiziert. In Abbildung 2.38A ist die erfolgreiche Überexpression auf

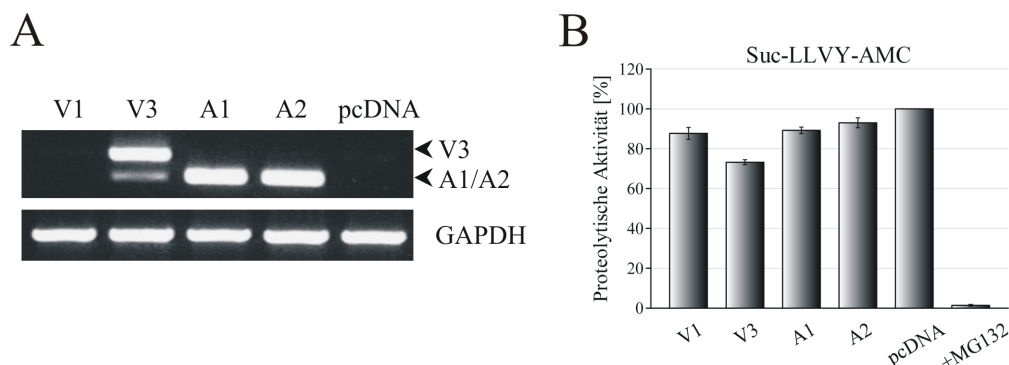


Abbildung 2.38: Expression von zwei Klonen des V3-Spleißartefakts sowie Messung der Proteasomaktivität. HeLa-Zellen wurden mit V1, V3, A1 und A2 sowie dem pcDNA-Leervektor für 16h transfiziert. **(A)** RT-PCR mit V3-spezifischen Primern (3F/41R), zur Kontrolle der Überexpression von A1 und A2 auf RNA-Ebene. **(B)** Aktivitätstest der chymotrypsinähnlichen Aktivität des Proteasoms mit Lysaten transfizierter HeLa-Zellen, MG132 wurde mit einer Konzentration von 10 μ M eingesetzt. Die Überexpression des Spleißartefakts führte zu keiner Inhibition des Proteasoms.

RNA-Ebene zweier Klone (A1 und A2) dieser V3-Spleißvariante im Vergleich zur Überexpression von V3 dargestellt. Um den potentiellen Einfluß von A1 und A2 auf die Aktivität des Proteasoms im Vergleich zu V3 zu untersuchen, wurden Aktivitätstests mit Gesamtzelllysaten von entsprechend transfizierten HeLa-Zellen durchgeführt. Die Überexpression von A1 und A2 führte jedoch zu keiner Inhibition des Proteasoms (Abbildung 2.38B). Zusätzlich wurde im Westernblot überprüft, ob der Abbau des proteasomalen Substrates HERPUD-1 nach CHX-Behandlung transfizierter HeLa-Zellen durch A1 und A2 beeinträchtigt wird. Es war jedoch kein Einfluß der überexprimierten Spleißartefakte auf die Proteinmenge von HERPUD-1 im Vergleich zu V3 zu verzeichnen (Abbildung 2.39). Der Westernblot zeigte außerdem, daß auch durch die normale Überexpression von V3 das

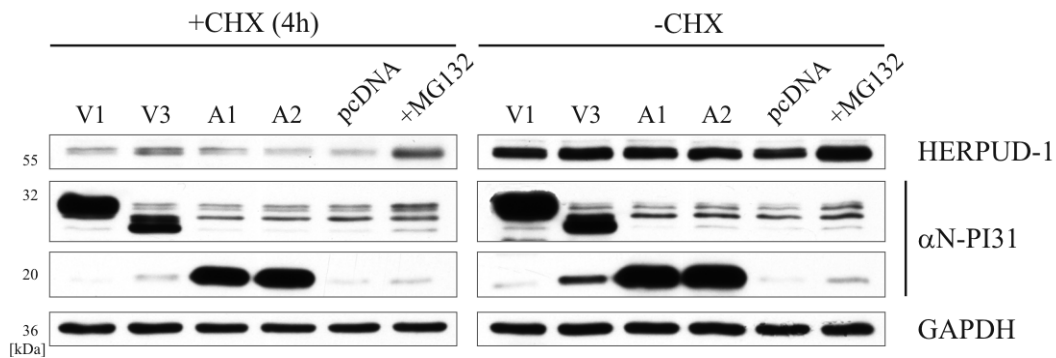


Abbildung 2.39: Westernblot zur Überprüfung, ob die Überexpression des V3-Spleißartefakts die Proteinmenge von HERPUD-1 beeinflusst. HeLa-Zellen wurden mit V1, V3, A1 und A2 für 16h transfiziert und anschließend mit 50 µg/ml CHX für 4h (+CHX) behandelt, MG132 (10 µM) wurde 4h vor Ernte zu den Zellen gegeben. Im Westernblot erfolgte der Nachweis der überexprimierten Proteine im Gesamtzelllysate mit dem αN-PI31 Antikörper. Im Vergleich zu V3 kam es durch die Überexpression von A1 und A2 zu keiner Zunahme der Proteinmenge von HERPUD-1.

zusätzlich gespleißte Transkript in Protein übersetzt wird. Interessanterweise wurde in den anderen Ansätzen (V1, pcDNA und MG132-Kontrolle) ebenfalls ein Signal in der Größenordnung der V3-Spleißform detektiert. Es ist jedoch unklar, ob dieses detektierte Protein identisch mit der V3-Variante ist.

Die Versuche zeigen, daß diese spezielle Spleißform allein wahrscheinlich nicht für die inhibitorische Wirkung von V3 verantwortlich ist. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß V3 nur zusammen mit dem veränderten Protein den inhibitorischen Einfluß auf das Proteasom ausübt. Um diese Möglichkeit zu überprüfen, müßten die Spleißstellen im V3-Expressionsvektor durch Mutagenese inaktiviert werden. Die Identifizierung dieser artifiziellen Spleißform macht außerdem deutlich, daß es bei Experimenten mit überexprimierten Proteinen zu unerwünschten Nebenprodukten kommen kann, die möglicherweise Ergebnisse verfälschen können.

Kapitel 3

Diskussion

3.1 Alternatives Spleißen des PI31-Gens *PSMF1*

Alternatives Spleißen ist einer der wesentlichen evolutionären Mechanismen für eine große Proteinviefalt aus einer begrenzten Anzahl an Genen. Der Großteil (60–75%) aller Multi-Exon Gene des Menschen (Johnson et al., 2003) und auch der Maus (Zavolan et al., 2003) wird alternativ gespleißt. Dabei scheint es, daß die Größe einer Genfamilie, also z. B. duplizierte Gene, mit deren Zahl an alternativen Spleißformen negativ korreliert (Kopelman et al., 2005). Für das PI31-Gen *PSMF1* trifft diese Beobachtung zu, da es im humanen Genom kein homologes Gen gibt, *PSMF1* aber vielfältige Transkripte hervorbringen kann. Die Regulation der Genexpression durch Spleißen ist vielseitiger als die Regulation der Promotoraktivität, die hauptsächlich nur die Menge des entstehenden Transkripts bestimmt. Alternatives Spleißen moduliert hingegen die Stabilität der mRNA sowie die Eigenschaften und Struktur der Proteine, indem neue Proteinabschnitte eingefügt oder weggelassen werden. Diese Veränderungen können im extremsten Fall einen kompletten Funktionsverlust zur Folge haben oder sie verändern z. B. nur die Bindungseigenschaften oder Lokalisierung des Proteins (Stamm et al., 2005).

Die Detektion von neun weiteren Spleißvarianten neben PI31 auf RNA-Ebene zeigt, daß *PSMF1* nicht ausschließlich für ein Protein kodiert, sondern für eine Vielzahl weiterer Isoformen (siehe S. 14, Abb. 2.2). Aus Datenbanken geht zudem hervor, daß es mindestens noch sechs weitere Spleißformen gibt (Datenbank Aceview Apr07). Einige der potentiell resultierenden Proteine unterscheiden sich von PI31 nur geringfügig um wenige Aminosäuren im C-Terminus (z. B. V2 und V3), andere hingegen, wie V5 und V6, besitzen durch die Verwendung eines alternativen ersten Exons einen völlig anderen N-Terminus.

Welche Auswirkungen hat das Weglassen oder Hinzukommen einzelner Exons auf Proteindomänen von PI31? Eine Möglichkeit, durch Spleißen ein neues Protein hervorzubringen, ist, mit dem Weglassen eines symmetrischen Exons (*exonskipping*) eine bestimmte Domäne im Protein zu entfernen, ohne den Leserahmen zu verändern. Das Entfernen von Exon 2 hat so zur Folge, daß bei den PI31-Isoformen V7, V8 und V10 ein 38AS langer Abschnitt des globulären N-Terminus fehlt (siehe Anhang S. 68, Abb. 4.2A). Tatsächlich konnte in diesem Bereich für bestimmte Aminosäurereste eine schwache Konservierung zwischen PI31 und dem F-Box Protein Fbxo7 in diversen Spezies festgestellt werden (siehe S. 59, Abb. 3.2; Kay Hofmann, nicht veröffentlichte Daten; Kirk et al., 2008).

Weiterhin wird die Proteasomregulator-domäne (PI31_Prot_Reg) von PI31 fast vollständig von Exon 9 kodiert, das beim Transkript V9 fehlt (siehe Anhang S. 68, Abb. 4.2B). Bei den Spleißvarianten V2 und V3 führt das Fehlen der unsymmetrischen Exons 11 bzw. 10 zu einer Verschiebung des Leserahmens, so daß geringfügig kürzere Proteine als PI31 entstehen. Der auffälligste Unterschied zwischen den Transkripten V2 und PI31 liegt jedoch nicht im Protein selbst sondern im Fehlen von fast 1200bp, die einen Großteil der 3'UTR der PI31-mRNA darstellen und das erste potentielle poly(A)-Signal (A1) beinhalten. Das Weglassen dieses Abschnittes hat die Nutzung eines der anderen poly(A)-Signale zur Folge sowie den Verlust von potentiellen regulatorischen Elementen der 3'UTR. Mögliche resultierende Konsequenzen werden im Abschnitt 3.2.2 diskutiert.

Alternatives Spleißen ist ein streng regulierter Prozeß, wobei die Regulation auf mehreren Ebenen stattfindet (House und Lynch, 2008). Durch Mutationen der genomischen Sequenz (cis-agierend) sowie Veränderungen der Proteinkonzentration beteiligter Spleißfaktoren (trans-agierend) kann es jedoch zu fehlerhaften Spleißvorgängen kommen, wie es bei krebsassoziierten Genen beobachtet wurde (Brinkman, 2004). Cis-agierende Veränderungen haben häufig ein verfrühtes Stopcodon in der kodierenden Sequenz zufolge, wodurch die entstehende mRNA über den *nonsense mediated mRNA decay* (NMD) schnell wieder abgebaut wird (Nagy und Maquat, 1998).

Die Transkripte V4 und V10 sind potentielle Kandidaten für den NMD, da bei beiden das Weglassen des unsymmetrischen Exons 4 zu einem verfrühten Stopcodon in Exon 6 führt. Für V4 konnte zusätzlich gezeigt werden, daß die Stabilität seiner mRNA in HeLa-Zellen deutlich geringer ist als die der anderen untersuchten Spleißvarianten (siehe S. 19, Abb. 2.7). Eine physiologisch relevante Rolle für diese Spleißformen kann trotzdem nicht vollständig ausgeschlossen werden. Es wurde gezeigt, daß die Genexpression durch die Produktion von Spleißvarianten, die durch den NMD abgebaut werden, posttranskriptionell reguliert werden kann. Dieser Prozeß wird als *regulated unproductive splicing and translation* (RUST) bezeichnet (Lewis et al., 2003; Hillman et al., 2004). So reguliert z. B.

das *polypyrimidine tract binding protein* (PTB) seine eigene Expression auf diese Weise; ist zuviel PTB vorhanden, wird das „unproduktive“ Spleißen seiner prä-mRNA bevorzugt und die entstehende mRNA mit verfrühtem Stopcodon durch den NMD abgebaut (Wollerton et al., 2004).

Interessanterweise existiert in der Maus ein ähnliches Transkript wie V4 (Transkript hSep07 in Aceview Mouse Jun07) Dieser Spleißform fehlt ebenfalls Exon 4 und kodiert somit für eine sehr kurze Isoform von PI31 (*mouseV4* = 96AS; *humanV4* = 99AS). Allerdings scheint das murine Transkript kein Substrat des NMD zu sein, da sich das Stopcodon im letzten Exon befindet, im Gegensatz zum humanen V4.

Die Transkripte des Gens *PSMF1*, die sich am deutlichsten von PI31 unterscheiden, sind V5 und V6 (siehe Anhang S. 67, Abb. 4.1). Sie sind die einzigen PI31-Isoformen, die im Kern lokalisieren. Der C-Terminus von V5 ist identisch mit dem von PI31, während der von V6 zusätzliche 44 Aminosäuren aber ebenfalls die prolinreichen Erkennungsmotive der GYF-Domäne von CD2BP2 enthält (Kofler et al., 2005a). Von CD2BP2 ist bekannt, daß es im Kern lokalisiert und an der Assemblierung eines Subkomplexes des Spleißosom beteiligt ist (Kofler et al., 2004; Laggerbauer et al., 2005). Da gezeigt wurde, daß die GYF-Domäne prinzipiell in der Lage ist, die entsprechenden Motive im C-Terminus von PI31 zu binden (Kofler et al., 2005a), ist nicht auszuschließen, daß V5 und V6 ebenfalls an derartigen Prozessen beteiligt sind. In dieser Arbeit konnte zwar keine Interaktion von V5 mit CD2BP2 festgestellt werden, aber möglicherweise bedarf es anderer experimenteller Bedingungen, wie z. B. eines Stimulus, um eine Bindung nachzuweisen.

Die Isoform V5 wird gewebespezifisch ausschließlich in Testikeln sehr stark exprimiert. Möglicherweise spielt V5 eine Rolle in der Entwicklung von Keimzellen, da in diesen, neben dem Gehirn und der Leber, am häufigsten alternative Spleißprodukte, sowie durch gewebespezifische Promotoren transkribierte Gene auftreten (Yeo et al., 2004). Unterstützend kommt hinzu, daß es in der Maus ebenfalls ein V5-Transkript gibt (zu 78% homolog), wobei die entsprechenden cDNAs ausschließlich aus testikelspezifischen Zellen amplifiziert wurden (Transkript dSep07 in Aceview Mouse Jun07).

Da in dieser Arbeit keine humanen Keimzellen zur Verfügung standen, wurde versucht, V5 in einer Testikelkrebszelllinie (Tera-1) zu detektieren, jedoch ohne Erfolg (Daten nicht gezeigt). Dieses Ergebnis spricht zusätzlich für eine ausschließliche Expression in Keimzellen. Die Ursachen dafür sind z. B. spleißrelevante RNA-bindende Proteine (z. B. RBMY, hnRNPG-T, T-STAR etc.), die nur in Keimzellen exprimiert werden (Elliott und Grellscheid, 2006). Zudem gibt es spezialisierte Basalpromotorsequenzen und exklusiv in Keimzellen vorkommende Varianten der basalen Transkriptionsfaktoren (wie TBP, TFI-IA und div. TAFs) (DeJong, 2006). Da die Varianten V5 und V6 unter der Kontrolle eines

alternativen Promotors stehen, wäre es interessant zu untersuchen, ob diese Transkripte keimzellspezifisch exprimiert werden und eine Rolle bei der Spermatogenese spielen.

3.2 Regulation von PI31

3.2.1 Induktion durch virusassoziierte Stimuli

Die gezeigte Induktion von PI31 durch Typ I-Interferone und Doppelstrang-RNA (dsRNA) ließe die Schlußfolgerung zu, daß es sich bei PI31 (bzw. *PSMF1*) um ein sogenanntes *virus stress inducible gene* handelt. Diese Gene sind eine Untergruppe der IFN-stimulierten Gene, die zusätzlich auch durch dsRNA, virale Proteine und DNA induziert werden können (Sen und Peters, 2007). Der bekannteste Rezeptor für dsRNA ist TLR3, dessen Signalweg zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren NF- κ B und IRF führt (Alexopoulou et al., 2001). Im Promotor von *PSMF1* existieren mehrere potentielle NF- κ B-Bindungsstellen sowie eine für IRF-1, jedoch führte die Überexpression von TLR3 nicht zu einer stärkeren Induktion von PI31 durch poly(IC). Außerdem gelang es nicht, die Expression des Reportergens in den Promotorstudien durch dsRNA, ob mit oder ohne TLR3-Überexpression, zu steigern. Es besteht die Möglichkeit, daß PI31 durch andere dsRNA-abhängige Signalwege induziert wird. Weitere cytosolische dsRNA-Sensoren sind die RNA-Helikasen RIG-I und Mda-5 (Yoneyama et al., 2004; Kang et al., 2002), deren Signalweg ebenfalls zur Aktivierung von NF- κ B und IRF führt. Hinsichtlich der Promotorstudien kann außerdem nicht ausgeschlossen werden, daß es zusätzliche regulatorische Elemente außerhalb des untersuchten Promotorbereichs (-1500bp) gibt.

Daß PI31 durch Virusinfektionen induziert werden kann, wurde mehrfach gezeigt (Zaiß, 2000; Shin et al. und U. Kuckelkorn, jew. nicht veröffentlichte Daten). Zaiß et al. vermuteten, daß ein funktioneller Zusammenhang zwischen der viralen Induktion von PI31 und der durch PI31 beeinträchtigten Reifung des Immunoproteasoms in Mauszellen besteht, indem Viren PI31 nutzen, um der Immunantwort zu entkommen (Zaiß, 2000; Zaiß et al., 2002).

Ein Problem dabei ist jedoch die Stabilität der mRNA von PI31 sowie die des Proteins selbst. PI31 ist für mindestens 24h stabil (Zaiß, 2000, sowie nicht gezeigte Daten) und es stellt sich die Frage, wieso ein Protein mit langer Halbwertszeit schnell aufreguliert werden muß. Möglicherweise ist die erhöhte Stabilität von PI31 aber auch auf das verwendete Zellkulturmodell zurückzuführen. Da ein Einfluß von PI31 auf das Immunoproteasom in HeLa-Zellen nicht bestätigt werden konnte, kann keine abschließende Aussage gemacht werden, inwieweit die virale Induktion von PI31 im humanen System die gleichen Konsequenzen hat, wie im murinen System. In Zusammenhang mit der RNA/Protein-Stabilität steht

auch die Beobachtung, daß es nur zu einer relativ geringen Steigerung der PI31-Expression nach Stimulation mit poly(IC) kam. Daraus ließe sich schlußfolgern, daß, durch die an sich schon hohe Basalexpression, zelluläre Effekte von zusätzlichem induzierten PI31 nicht zu beobachten sind.

3.2.2 Promotor, 5' und 3'UTR von *PSMF1*

Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Promotorstudien belegen, daß die 5'UTR erheblichen Einfluß auf die Expression des Reportergens hat (s. S. 32, Abb. 2.23). Den Promotoren von vielen proteinkodierenden Genen in höheren Eukaryoten ist gemein, daß sie zwei spezielle DNA-Elemente besitzen, die für die korrekte Initiierung der Transkription durch die RNA-Polymerase II verantwortlich sind. Diese sind zum einen das konservierte TATA-Motiv, etwa 30 Nucleotide aufwärts vom Transkriptionsstart lokalisiert und zum anderen das Initiator-Element, das den Transkriptionsstart umfaßt und dessen Sequenz nicht konserviert zu sein scheint. Viele Gene, u. a. *housekeeping*-Gene, besitzen jedoch kein TATA-Motiv, so daß deren basale Transkription hauptsächlich vom Initiator-Element abhängt (Weis und Reinberg, 1992). Der Promotor von *PSMF1* besitzt ebenfalls kein TATA-Motiv. Möglicherweise wurde bei der Klonierung der Promotorkonstrukte mit dem Ausschluß der 5'UTR das Initiator-Element zerstört, so daß basale Transkriptionsfaktoren nicht mehr binden können. Dafür spricht auch, daß die 5'UTR allein ebenfalls nicht in der Lage ist, die Expression zu aktivieren.

Typ I-Interferone induzieren die Expression von PI31. Auch in den Promotorstudien konnte eine deutliche Zunahme der Expression nach IFN α -Stimulation detektiert werden. Welche Promotorelemente in *PSMF1* dafür verantwortlich sind, ist jedoch unklar. Typischerweise verläuft der Signalweg nach IFN-Stimulation über den JAK/STAT-Weg, wobei STAT eine Familie von Transkriptionsfaktoren ist, die an die Sequenzelemente ISRE¹ und GAS² im Promotor der Zielgene binden und die Transkription initiieren (Platanias, 2005). Beide Elemente wurden jedoch nicht im untersuchten Promotorbereich von *PSMF1* gefunden. Es konnte allerdings eine potentielle Bindungsstelle für den *interferone regulatory factor* 1 (IRF-1) identifiziert werden. Dessen Expression wird durch IFN α über den JAK/STAT-Weg induziert, so daß er als sekundärer Transkriptionsfaktor für die Expression weiterer Zielgene dient (Harada et al., 1989; Taniguchi und Takaoka, 2002). Um die Funktionalität des IRF-1 Elements zu überprüfen, wäre es sinnvoll, dieses in den entsprechenden Promotorkonstrukten zu mutieren.

¹IFN-stimulated response elements

²IFN γ -activated sites

Neben der essentiellen Funktion der 5'UTR für die Transkription, wurde ein negativer Einfluß der 3'UTR der PI31-mRNA auf die Expression des Reportergens festgestellt (s. S. 32, Abb. 2.23). Die untranslatierten Regionen von mRNAs spielen eine wichtige Rolle in der posttranskriptionellen Genregulation. So hat die 3'UTR z. B. Einfluß auf die subzelluläre Lokalisierung der mRNA, deren Stabilität sowie die Effizienz der Translation (Mignone et al., 2002).

Die Stabilität und auch die Translation der mRNA wird häufig über AU-reiche Elemente (AREs) in der 3'UTR reguliert (Zhang et al., 2002). Die 3'UTR von PI31 beinhaltet neun AREs der Klasse I (AUUUA-Pentamere), sowie weitere potentiell regulatorisch wirksame Motive, wie z. B. ein cytoplasmatisches poly(A)-Element (Mendez und Richter, 2001) (siehe Anhang Seite 70, Abb. 4.4).

Es besteht die Möglichkeit, daß die PI31-mRNA mit der über 3kb langen 3'UTR in HeLa-Zellen instabil ist und schnell abgebaut wird. Das würde auch die kaum detektierbare Menge der Reportergen-mRNA der 3'UTR-Konstrukte in der PCR erklären, sowie die daraus resultierende extrem verminderte Translation des CAT-Reportergens. Es existieren zudem sechs verschiedene poly(A)-Signale in der PI31-mRNA, wodurch die 3'UTR unterschiedliche Längen von mindestens 400bp bis maximal 3300bp aufweisen kann. Jedoch ist nicht eindeutig, welches Signal hauptsächlich genutzt wird. Ein Hinweis könnte sein, daß im Northernblot ein Hauptsignal bei etwa 1,5kb detektiert wurde (siehe Seite 18, Abb. 2.6). Dieses Transkript läßt auf die Nutzung des ersten poly(A)-Signals schließen, wodurch die entstehende 3'UTR von ca. 400bp kein AU-reiches Element mehr enthält. Unterstützend für die Annahme, daß der Hauptanteil der zellulären PI31-mRNA nur eine kurze 3'UTR besitzt, kommt hinzu, daß es nicht gelang, das Transkript in voller Länge (~4100bp) oder mit 3'UTR-Abschnitten länger als 1000bp aus HeLa-RNA zu amplifizieren (siehe auch S. 16, Abb. 2.4). Die Stabilität der PI31-mRNA in HeLa-Zellen für mindestens 8h nach Behandlung mit dem Transkriptionsinhibitor α -Amanitin spricht ebenfalls für eine kurze UTR. Yang et al. (2003) untersuchten mittels Microarrays die Abbauraten von mRNAs aus einer Krebs- sowie einer Primärzelllinie und stellten eine durchschnittliche Halbwertszeit von etwa 10h fest. Dabei fanden sie Hinweise, daß mRNAs mit einer 3'UTR länger als 1kb signifikant schneller abgebaut werden als mit einer kurzen 3'UTR.

Für PI31 stellt sich die Frage, unter welchen Bedingungen es vonnöten ist, die vollständige 3'UTR zu erzeugen bzw. wann die Regulation über die 3'UTR geschieht. Es wäre beispielsweise vorstellbar, daß eine gewebeabhängige Expression und Regulation besteht. Obwohl die mRNA von PI31 in allen untersuchten humanen Geweben gleichmäßig exprimiert wird, ist nicht auszuschließen, daß die Halbwertszeit der RNA je nach Gewebe unter-

schiedlich ist. Für mL-1RAcP³ konnte z. B. gezeigt werden, daß die 3'UTR für eine schnelle Degradation der mRNA ($T_H \sim 5h$) in HepG2-Zellen verantwortlich ist, wohingegen in HEK293-Zellen die Halbwertszeit ca. 48h betrug (Jensen und Whitehead, 2004). Jensen und Whitehead konnten bisher unbekannte regulatorische Motive in der 3'UTR identifizieren, die möglicherweise von gewebespezifisch exprimierten Proteinen erkannt werden.

Da die Proteinexpression von PI31 bisher noch nicht in verschiedenen menschlichen Geweben untersucht wurde, wäre es interessant zu überprüfen, inwieweit sich diese von der mRNA-Expression unterscheidet und welche Halbwertszeiten RNA und Protein haben. PI31 konnte z. B. in der Gewebe-PCR gut im Gehirn detektiert werden (siehe Seite 16, Abb. 2.5) und wird laut Northernblotanalyse gleichmäßig in verschiedenen Gehirnregionen der Ratte exprimiert (Ding und Keller, 2001). Überraschenderweise ließ sich jedoch das Protein nur sehr schwach in Gehirnlysaten nachweisen (s. S. 22, Abb. 2.11), was auf eine verminderte Translation schließen lassen könnte.

Der Einfluß der 3'UTR von PI31 auf die Stabilität sowie die Translation der mRNA ließe sich gut durch Reportergenkonstrukte überprüfen. So könnten Deletionen der AUREICHEN Elemente sowie verschieden lange 3'UTR-Sequenzen, z. B. entsprechend den diversen poly(A)-Signalen, untersucht werden. Hierbei wäre es sinnvoll, die Experimente in Zelllinien unterschiedlichen Gewebeerstoffs durchzuführen, um eine mögliche gewebespezifische Regulation zu untersuchen. In dieser Arbeit wurde bereits die um 1200bp kürzere 3'UTR der Spleißvariante V2 mit Reportergenkonstrukten überprüft. Da die Expression des Reportergens genauso gering wie mit vollständiger 3'UTR war, kann davon ausgegangen werden, daß die inhibitorischen Elemente nicht in den ersten 1200bp der UTR liegen (siehe Anhang S. 70, Abb. 4.4).

Einen weiteren Regulationsmechanismus auf posttranskriptioneller Ebene stellen microRNAs (miRNAs) dar, die mit der 3'UTR von Ziel-RNAs assoziieren und deren Stabilität oder Translation meist negativ beeinflussen (He und Hannon, 2004). In der 3'UTR der PI31-mRNA gibt es mehrere potentielle Bindungsstellen für miRNAs (miR-103/107, miR-138, miR-181 und miR-217 laut <http://www.targetscan.org>) die in verschiedenen Säugerarten konserviert sind. Es wird geschätzt, daß ein Drittel aller proteinkodierenden Gene von miRNAs reguliert wird, wobei der Großteil der miRNAs gewebespezifisch exprimiert wird. So konnte z. B. für die eben erwähnte microRNA miR-138 eine Gehirnspezifität festgestellt werden (Landgraf et al., 2007). Die Expression von PI31 wurde bisher fast nur in Krebszelllinien bzw. transformierten Zellen untersucht. Es wurde jedoch gezeigt, daß mehr als die Hälfte aller bisher bekannten miRNAs in Tumorgeweben geringer exprimiert wird als in normalen Geweben (Lu et al., 2005). Es kann also nicht ausgeschlossen werden, daß

³membrane-bound IL-1R accessory protein

sich die Regulation von PI31 sowie dessen Expressionsmuster je nach verwendetem Zellkulturmodell unterscheidet, was die Aufklärung seiner korrekten Funktion erschwert.

3.3 Funktion von PI31 und der Isoform V3

PI31 und V3 beeinflussen beide die Halbwertszeit von proteasomalen Substraten. Das vermehrte Auftreten der untersuchten Proteine bei gleichbleibender RNA-Menge durch die Überexpression von V3, ließe sich mit der Inhibition des Proteasoms durch V3 und die daraus resultierende Akkumulation von HERPUD-1, CD3 δ , p53 und Nrf2 erklären. Eine Inhibition durch PI31 konnte jedoch mittels fluorogener Peptidsubstrate nicht festgestellt werden, so daß die erhöhte Proteinmenge von p53 und HERPUD-1 nach Überexpression von PI31 möglicherweise auf einem anderen Mechanismus beruht. Die Annahme, daß die Überexpression von PI31 und V3 ER-Streß auslöst und dadurch z. B. die Menge der HERPUD-1-mRNA erhöht, bestätigte sich nicht. Weder HERPUD-1 noch das Spleißen der Xbp1-mRNA als ER-Streß-Marker (Calfon et al., 2002) wurden auf RNA-Ebene induziert.

In vitro wurde gezeigt, daß der C-Terminus von PI31 für die hochaffine Bindung an das Proteasom verantwortlich ist und dadurch die Inhibition der proteasomalen Aktivität hervorruft (Zaiß et al., 1999; McCutchen-Maloney et al., 2000). Der Mechanismus der Inhibition durch V3 ist jedoch nicht ersichtlich, da *in vivo* keine direkte Assoziierung von V3 mit dem Proteasom unter den gewählten Bedingungen festgestellt werden konnte und bisher keine *in vitro*-Daten vorliegen. V3 ist zu 97% mit PI31 homolog, der geringe Unterschied in der Aminosäuresequenz hat aber zur Folge, daß sich bei V3 theoretisch eine Beta-Faltblattstruktur am C-Terminus bilden kann (Abbildung 3.1).

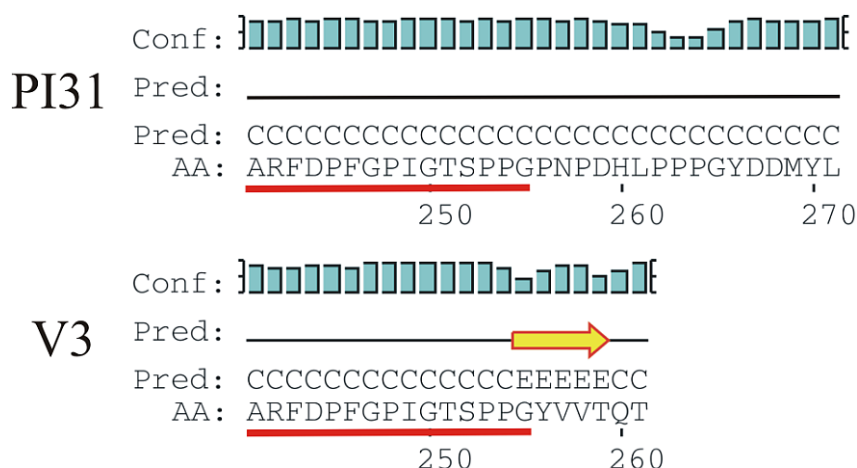


Abbildung 3.1: Sekundärstrukturvorhersage (Programm PSIPRED) für den C-Terminus von V3 im Vergleich zu PI31. Rot unterstrichen ist der homologe Sequenzbereich, der gelbe Pfeil stellt eine mögliche Faltblattstruktur dar.

Inwieweit diese Struktur für die Inhibition *in vivo* verantwortlich ist und ob diese direkt oder indirekt geschieht, kann mit den vorliegenden Daten nicht gesagt werden. Eine Möglichkeit wäre, die sechs C-terminalen Aminosäuren von V3 zu mutieren und den Einfluß auf das Proteasom zu überprüfen. Mit Hilfe von Koimmunpräzipitationen einer getaggten Variante von V3 sowie evtl. Vernetzerexperimenten ließe sich feststellen, ob V3 direkt mit dem 20S interagiert oder aber beispielsweise mit dem 19S Regulator. Da die Inhibition nur maximal 20–40% beträgt, wäre vorstellbar, daß V3 die Aktivierung des Proteasoms durch den 19S-Komplex beeinträchtigt, jedoch nicht dessen Assoziierung mit dem 20S. Da 20S Proteasomen zwei bis dreimal häufiger in der Zelle vorkommen als 26S Proteasomen (Brooks et al., 2000; Tanahashi et al., 2000), ließe sich die gemessene Restaktivität den freien 20S Proteasomen zuschreiben.

Bisher ist nur eine begrenzte Anzahl an Proteinen bekannt, die das Proteasom *in vitro* und/oder *in vivo* inhibieren. So konnte z. B. gezeigt werden, daß Aggregate oder Oligomere von α -Synuclein, β -Amyloid und Huntingtin die proteasomale Aktivität sowohl *in vitro* als auch *in vivo* durch Anlagerung an das Proteasom hemmen (Gregori et al., 1995; Holmberg et al., 2004; Lindersson et al., 2004; Almeida et al., 2006). Die inhibitorische Wirkung von α -Synuclein ist jedoch nicht gesichert, da sie u. a. von den jeweiligen zellulären Bedingungen abzuhängen scheint (M. Dyllick-Brenzinger, pers. Komm.). Ein außergewöhnlicher endogener Inhibitor ist das prolin- und argininreiche Peptid PR39, das, soweit bisher bekannt, ausschließlich die Degradation von I- κ B α sowie von *hypoxia-inducible factor-1 α* durch das Proteasom hemmt (Gao et al., 2000; Li et al., 2000). Jüngst wurde auch ein bakterielles Peptid (SylA) eines Pflanzenpathogens beschrieben, das eukaryotische Proteasomen irreversibel inhibieren kann (Groll et al., 2008).

Die Wirkung der eben beschriebenen Inhibitoren unterscheidet sich jedoch von der V3-Inhibition im Falle des PR39 Peptids durch die Substratspezifität oder die Möglichkeit der Aggregatbildung bei α -Synuclein und β -Amyloid.

Eine interessante Verbindung von PI31 und dessen Isoformen mit dem Ubiquitin-Proteasom-System stellt die, wenn auch geringe, Ähnlichkeit mit dem F-Box Protein Fbxo7 dar (Kay Hofmann, nicht veröffentlichte Daten; Kirk et al., 2008). Dieses Protein weist neben konservierten N-terminalen Aminosäuren ebenfalls Homologien zum C-Terminus von PI31 auf (Abbildung 3.2). F-Box Proteine sind Komponenten von SCF (Skp1, Cullin1, F-Box) E3-Ubiquitinligasekomplexen und verantwortlich für die Erkennung von zu ubiquitinierenden Substraten (Ho et al., 2006). Eine zum Ende dieser Arbeit veröffentlichte Studie über PI31 konnte jetzt einen strukturellen und möglicherweise funktionellen Zusammenhang zu Fbxo7 zeigen (Kirk et al., 2008). Interessanterweise besitzen beide Proteine eine konservierte Dimerisierungsdomäne, durch die es zur Heterodimerbildung von PI31 und Fbxo7

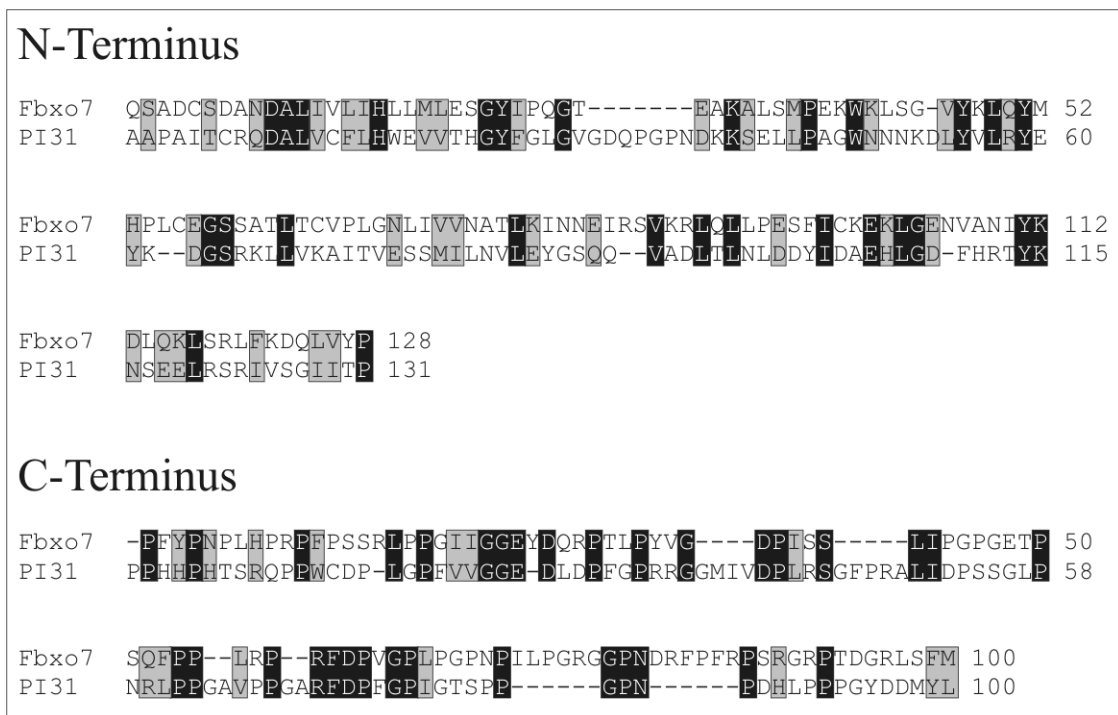


Abbildung 3.2: Aminosäuresequenzvergleich (ClustalW2) der konservierten Bereiche im N- und C-Terminus von PI31 (N-Term. AS 11–141; C-Term. AS 172–271) und Fbxo7 (N-Term. AS 188–315; C-Term. AS 423–522). Schwarze Boxen zeigen gleiche AS und graue ähnliche AS, die Zahlen beziehen sich auf die Länge der verglichenen Sequenzen.

kommen kann. Diese sogenannte Fbxo7/PI31 (FP)-Domäne ist im N-Terminus von PI31 lokalisiert und ermöglicht zusätzlich die Homodimerisierung (Abbildung 3.3) (Kirk et al., 2008). Daß PI31 Homodimere bilden kann, zeigten schon Ma et al. (1992) *in vitro* und bestätigte sich auch in den hier durchgeführten Vernetzungsexperimenten mit lebenden Zellen (siehe S. 35, Abb. 2.25). Da die PI31-Isoformen V2, V3 und V9 den gleichen N-Terminus wie PI31 besitzen, ist es sehr wahrscheinlich, daß sie ebenfalls als Homodimere auftreten und mit Fbxo7 interagieren können (siehe S. 20, Abb. 2.9 sowie S. 68, Abb. 4.2B). Eine Heterodimerisierung dieser Isoformen mit PI31 ist deshalb ebenso möglich.

Durch die nun aufgeklärte Struktur der FP-Domäne und die Art der Homodimerisierung, läßt sich auf die räumliche Orientierung der zwei PI31-Moleküle im Dimer schließen. So ist es wahrscheinlich, daß sie entgegengesetzt zueinander interagieren, und damit die prolinreichen C-Termini jeweils frei zugänglich für andere Interaktionen sind (Abbildung 3.4). Heterodimere aus PI31 und den Isoformen V2, V3 oder V9 würden eine größere Vielfalt an möglichen Interaktionen gewährleisten, da sich die C-Termini der Isoformen von PI31 unterscheiden.

Bezüglich der Homodimerisierung von Fbxo7 diskutierten Kirk et al., daß sie evtl. für die Ubiquitinligaseaktivität des SCF-Komplexes benötigt wird, so wie es z. B. für das F-Box

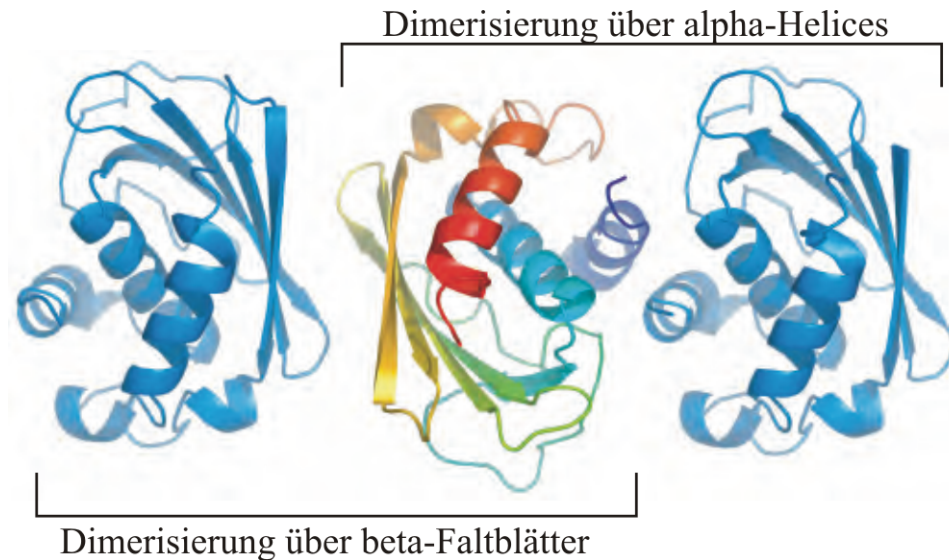


Abbildung 3.3: Kristallstruktur der N-terminalen FP-Domäne von PI31 mit Angabe der möglichen Dimerbildungen. PI31-Homodimere interagieren hauptsächlich über die alpha-helikale Oberfläche, PI31/Fbxo7-Heterodimere interagieren über die beta-Faltblattstruktur; Abbildung verändert nach Kirk et al. (2008).

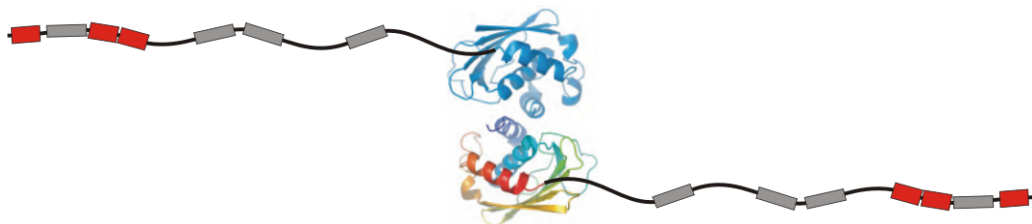


Abbildung 3.4: Modell der Dimerbildung von zwei PI31-Molekülen über die alpha-helikale Oberfläche des N-Terminus. Der unstrukturierte prolinreiche C-Terminus wurde jeweils schematisch dargestellt, rote Boxen symbolisieren die Erkennungsmotive der GYF-Domäne und graue Boxen potentielle Erkennungsmotive von SH3- und WW-Domänen. Da diese sich teilweise überschneiden, wurden sie nicht näher spezifiziert. Die Länge des C-Terminus und die Positionen der Motive sind nicht maßstabsgetreu (Struktur der FP-Domäne aus Kirk et al., 2008).

Protein Cdc4⁴ gezeigt wurde (Tang et al., 2007; Kirk et al., 2008). Die Fähigkeit zur Heterodimerisierung von PI31 und Fbxo7 deutet nun daraufhin, daß PI31 funktionell mit dem Prozeß der Ubiquitinierung verknüpft ist. Aufgrund des verzögerten Abbaus der untersuchten proteasomalen Substrate nach Überexpression von V3 und PI31 ließe sich schlußfolgern, daß beide Proteine mit Fbxo7 um die Dimerbildung kompetieren und somit eine Modulatorfunktion innehaben. Diese Möglichkeit ziehen auch Kirk et al. in Betracht, da sich die PI31-Bindungsstelle in Fbxo7 mit der Fbxo7-Homodimerisierungsdomäne überschneidet (Kirk et al., 2008). Von den untersuchten Substraten HERPUD-1, Nrf2, p53 und CD3 δ ist bekannt, daß sie ubiquitinabhängig degradiert werden (Yang et al., 1998; Sai et al., 2003; Kobayashi et al., 2004; Brooks und Gu, 2006). Es wäre interessant zu überprüfen, ob es durch die Überexpression von PI31 und V3 zu einer verminderten Ubiquitinierung dieser Proteine kommt. Bisher ist noch keine E3-Ubiquitinligase bekannt, die für die Ubiquitinierung von HERPUD-1 verantwortlich ist. Die in dieser Arbeit gezeigte Akkumulation von HERPUD-1 durch Überexpression von PI31 und dessen struktureller Zusammenhang mit Fbxo7 deutet nun darauf hin, daß möglicherweise der SCF^{Fbxo7}-Komplex als E3-Ligase von HERPUD-1 fungiert.

Eine mögliche andere Funktion für die Mitglieder der PI31-Familie wäre allerdings auch die Beteiligung an der Substraterkennung durch den SCF-Komplex. Die Homologie des prolinreichen Abschnitts von PI31 zu Fbxo7 unterstützt diese Vermutung (siehe Abb. 3.2). So wurde für Fbxo7 gezeigt, daß dessen prolinreicher C-Terminus die Interaktion mit den Proteinen HURP⁵ und cIAP1⁶ vermittelt, die daraufhin vom SCF^{Fbxo7}-Komplex ubiquitiniert werden (Hsu et al., 2004; Chang et al., 2006). Es wäre vorstellbar, daß durch die verschiedenen PI31-Isoformen in Verbindung mit Fbxo7 unterschiedliche Substratspezifitäten erzeugt werden. Die Akkumulation der untersuchten Substrate durch die Überexpression von PI31 und V3 rührt möglicherweise von einer verstärkten Homodimerbildung dieser PI31-Isoformen her, wodurch die Heterodimerisierung mit Fbxo7 beeinträchtigt werden könnte. Es wäre interessant zu überprüfen, ob die gleichzeitige Überexpression von Fbxo7 und evtl. weiterer Komponenten des SCF-Komplexes mit PI31 bzw. V3 die Akkumulation der proteasomalen Substrate verhindert. Daß ein funktioneller Zusammenhang zwischen PI31 und Fbxo7 bestehen kann, läßt sich auch aus ihrer Kolo-kalisierung am ER ableiten (Kirk et al., 2008) sowie der auffallend großen Ähnlichkeit ihrer mRNA-Expressionsmuster in verschiedenen humanen Geweben (Datenbank GNF SymAtlas, siehe Anhang S. 71, Abb. 4.5).

⁴cell division control protein 4

⁵hepatoma upregulated protein

⁶inhibitor of apoptosis

Humanes PI31 und vermutlich auch V3 lokalisieren am ER und im Cytoplasma, in Übereinstimmung mit den Daten für das murine System von Zaiß et al. (2002) (siehe S. 25, Abb. 2.15). Verschiedene Studien konnten zeigen, daß ein Teil der zellulären Proteasomen an Mikrosomen, d. h. ER, Golgi und teilweise Zellmembran, lokalisiert ist. So ermittelten Rivett et al. (1992) mit Hilfe von Immunogold-Markierung einen Anteil von 5–15% je nach Zelltyp, sowie in späteren Arbeiten durch Zellfraktionierung und Immunoblot etwa 11% mikrosomenassoziierte Proteasomen (Palmer et al., 1996; Brooks et al., 2000). Klare et al. (2007) reinigten 20S Proteasomen aus drei zellulären Kompartimenten (Kern, Cytosol u. Mikrosomen) und errechneten eine Menge von 25–27% mikrosomenassoziiierter Proteasomen. In einer kürzlich veröffentlichten Studie konnte zudem gezeigt werden, daß die Assemblierung von konstitutiven und Immunoproteasomen hauptsächlich am ER erfolgt (Fricke et al., 2007).

ER-assoziierte Proteasomen sind vermutlich am ERAD beteiligt, d. h. sie degradieren Proteine, die, meist aufgrund von Mißfaltung, aus dem ER wieder zurück ins Cytosol transportiert werden (Goldberg, 2003). Die wichtige Rolle von Immunoproteasomen bei der MHC-Klasse I vermittelten Antigenpräsentierung spiegelt sich auch in deren hauptsächlichlicher Lokalisierung am ER wider (Wójcik und DeMartino, 2003; Fricke et al., 2007). Zaiß et al. (2002) beschrieben PI31 als einen Modulator der Reifung des Immunoproteasoms im Maussystem, jedoch ließ sich diese Funktion in humanen Zellen nicht bestätigen. Interessanterweise weicht im Menschen und in der Maus die gewebespezifische mRNA-Expression von PI31 stark von der der Immununtereinheiten ab (Datenbank GNF Sym Atlas, siehe Anhang S. 71, Abb. 4.5). Zudem gibt es PI31-Homologe in Organismen, die über kein Immunoproteasom verfügen, so daß die physiologische Relevanz von PI31 als Modulator der Proteasomassemblierung unklar ist.

Das Ubiquitin-Proteasom-System ist an vesikulären Prozessen beteiligt, so reguliert es z. B. die Internalisierung von Glutamatrezeptoren in Synapsen und die Phagosomenreifung (Patrick et al., 2003; Lee et al., 2005). Möglicherweise spielt PI31 und/oder dessen Isoformen ebenfalls eine Rolle bei diesen Vorgängen. So wurde durch Proteomanalyse von *Drosophila*-Phagosomen neben Untereinheiten des Proteasoms auch ein PI31-Homolog (PSMF1_DROME, Q9V637) identifiziert (Stuart et al., 2007, *Suppl. Data*). Ein weiterer Hinweis ist das transiente Auftreten eines PI31-ähnlichen Proteins (DDB0204870, Q54S82) während der Phagosomenreifung im Schleimpilz *Dictyostelium discoideum* (Gotthardt et al., 2006, *Suppl. Data*).

Proteine mit prolinreichen Regionen sind oft an zellulären Prozessen beteiligt, die einer raschen Rekrutierung oder eines Austauschs von Proteinen bedürfen, so z. B. bei der synaptischen Vesikel-Endocytose (McPherson, 1999), der Initiierung der Transkription, in Signalkaskaden und bei cytoskelettaler Umordnung (Kay et al., 2000). Polyprolin-Sequenzen

können eine sog. PP II-Helix bilden, wobei diese Abschnitte sich meist am N- oder C-Terminus der Proteine befinden, wie es auch bei PI31 der Fall ist (siehe S. 60, Abb. 3.4). Sie bilden eine „verlängerte“ Struktur (*sticky arms*), die im Vergleich zu anderen exponierten Peptidsequenzen eine schnellere und bessere Bindung von Interaktionspartnern hervorruufen kann (Williamson, 1994). Es wäre somit vorstellbar, daß PI31-Homodimere oder Heterodimere der Isoformen V2, V3 oder V9 mit PI31 als eine Art „Doppel“-Adapter fungieren.

Die mRNA von PI31 wurde kürzlich als Bestandteil von IMP1⁷ Ribonucleoprotein-Partikeln (mRNP-Granulae) identifiziert, die zusätzlich zahlreiche Transkripte von Proteinen des ER/Golgi-Proteinsekretionsystems und des UPS beinhalten (Jønson et al., 2007). Bei mRNP-Granulae handelt es sich um RNA-Protein-Komplexe, die u. a. für den Transport bzw. die Lokalisierung von mRNAs zu ihrem Bestimmungsort in der Zelle verantwortlich sind. Es wird angenommen, daß mRNP-Granulae als posttranskriptionelle Operons fungieren, d. h. die enthaltenen Transkripte kodieren für Proteine, die an ähnlichen zellulären Prozessen beteiligt sind (Keene und Tenenbaum, 2002). Auf diese Weise wird gewährleistet, daß die Translation und Regulation der RNAs bzw. Proteine effizient an dem Ort geschieht, wo sie benötigt werden. Die Identifizierung der mRNA von PI31 neben Transkripten von ER/Golgi-assoziierten Proteinen (z. B. Sec61 bzw. COPZ1⁸) und zahlreichen ubiquitin-konjugierenden Enzymen und E3-Ubiquitinligasen in einem posttranskriptionellen Operon unterstützt damit die gezeigte Lokalisierung von PI31 am ER und dessen vermutete Funktion bei der Ubiquitinierung.

3.3.1 Interaktionspartner

Um die genaue Funktion von PI31 zu entschlüsseln, ist es unerlässlich, *in vivo*-Interaktionspartner zu identifizieren. Durch die Arbeit von Kirk et al. (2008) wurde nun erstmals mit Fbxo7 ein Protein ermittelt, das mit PI31 *in vivo* interagiert und es in den funktionellen Kontext der Ubiquitinierung bzw. Substraterkennung durch F-Box Proteine bringt.

PI31 bindet *in vitro* das Proteasom (Zaiß et al., 1999; McCutchen-Maloney et al., 2000). *In vivo* konnte jedoch in dieser Arbeit unter den gewählten Bedingungen keine eindeutige Interaktion festgestellt werden. Ein Grund dafür könnte sein, daß die Bindung nur transient ist, dagegen sprechen aber u. a. die durchgeführten Vernetzungsexperimente und auch das unterschiedliche Migrationsverhalten von PI31 und dem Proteasom im Dichtegradienten. Der prolinreiche Abschnitt von PI31 enthält mehrere mutmaßliche Erkennungsmotive für prolinbindende Domänen (siehe S. 20, Abb. 2.9). So wäre es wahrscheinlich, daß der

⁷ *Insulin-like growth factor II mRNA-binding protein*

⁸ *coatamer protein complex 1*

für die Interaktion mit dem Proteasom verantwortliche C-Terminus in der Zelle maskiert vorliegt, d. h. von anderen Proteinen gebunden ist. In einer kürzlich vorgestellten Studie konnte jedoch PI31 zusammen mit dem Proteasom durch Affinitätsreinigung isoliert werden (Bousquet-Dubouch et al., 2008). Es ist allerdings nicht klar, ob es sich dabei um eine direkte Interaktion handelt oder ob die Bindung indirekt über weitere Proteine vermittelt wird. Aufgrund der Heterodimerisierung von PI31 und Fbxo7 wäre es vorstellbar, daß Fbxo7 eine indirekte Interaktion von PI31 mit dem Proteasom ermöglicht. Fbxo7 enthält eine N-terminale ubiquitinähnliche Domäne, die möglicherweise mit den ubiquitinbindenden Untereinheiten des proteasomalen 19S Regulators interagiert (Hicke et al., 2005; Husnjak et al., 2008; Schreiner et al., 2008).

Kofler et al. konnten mit Peptidbindungsassays und einem *yeast two-hybrid* Interaktionssystem eine Interaktion von CD2BP2 mit dem isolierten prolinreichen C-Terminus von PI31 zeigen (Kofler et al. (2005a)). In der vorliegenden Arbeit wurde allerdings keine Interaktion des kompletten Proteins PI31 mit CD2BP2 mittels Koimmunpräzipitationen aus Zellysaten unter den gewählten Bedingungen festgestellt. Möglicherweise ist das auf die unterschiedliche zelluläre Lokalisierung der Proteine, PI31 im Cytosol, CD2BP2 im Zellkern (Kofler et al., 2004), zurückzuführen und den damit fehlenden funktionellen Zusammenhang. Obwohl die PI31-Isoform V5 im Zellkern lokalisiert ist, konnte ebenfalls keine Interaktion von V5 mit CD2BP2 festgestellt werden (s. S. 36, Abb. 2.26). Allerdings ist nicht auszuschließen, daß V5 so wie CD2BP2 ein transienter Bestandteil des Spleißosoms ist und es sich nur um eine kurzfristige Interaktion handelt (Laggerbauer et al., 2005). Bezüglich der Gewebespezifität von V5 kann man auch spekulieren, daß die zellulären Bedingungen in HeLa-Zellen sich zu sehr von den in testikulären Zellen unterscheiden und für eine Wechselwirkung nicht geeignet sind.

In dieser Arbeit wurde versucht, weitere Interaktionspartner von PI31 zu identifizieren (s. S. 38, Tabelle 2.2). Die Spezifität der gefundenen Interaktionen ist jedoch nicht eindeutig, da nach Wiederholung des Experiments die massenspektrometrische Analyse der Proteinbanden aufgrund zu geringer Proteinmengen nicht möglich war. Die identifizierten Hitzeschockproteine (Chaperone) könnten in Zusammenhang mit der Überexpression von PI31 stehen, da diese auch eine erhöhte Aktivität von Chaperonen zur Folge hat, um eine korrekte Faltung des überexprimierten Proteins zu gewährleisten. Das Protein IQGAP1⁹ beinhaltet eine prolinbindende WW-Domäne und lokalisiert u. a. auch am ER (Rittmeyer et al., 2008), womit eine gewisse Wahrscheinlichkeit besteht, daß es mit PI31 interagiert.

⁹Ras GTPase-activating-like protein

3.4 Ausblick

Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Daten deuten darauf hin, daß humanes PI31 im Ubiquitin-Proteasom-System eine andere, bisher nicht vermutete Funktion hat und auf vielfältige Weise reguliert werden kann. Aus den Ergebnissen ergeben sich deshalb neue, interessante Fragestellungen zur Regulation und Funktion von PI31 und den PI31-Isoformen (Abbildung 3.5).

1. Wenn nicht der dsRNA-Rezeptor TLR3 für die Induktion von PI31 durch dsRNA verantwortlich ist, sind es dann möglicherweise die Rezeptoren RIG-I oder Mda-5? Und welche Transkriptionsfaktoren werden dadurch aktiviert und binden im Promotor des PI31-Gens *PSMF1*?
2. Welche regulatorischen Elemente in der 3'UTR von PI31 wirken sich inhibitorisch auf die Expression aus bzw. beeinflussen die Stabilität der mRNA?
3. Was für Funktionen haben die zahlreichen PI31-Isoformen und besonders V5, da es gewebespezifisch exprimiert wird und nur im Zellkern lokalisiert?
4. Gibt es weitere Interaktionspartner von PI31 bzw. V3 und gibt es eine über Fbxo7 vermittelte indirekte Interaktion von PI31 und V3 mit dem Proteasom bzw. 19S Regulator? Ließe sich dadurch möglicherweise die Inhibition des Proteasoms durch V3 erklären?
5. Hat PI31 als Interaktionspartner von Fbxo7 evtl. eine Funktion bei der Erkennung und Ubiquitinierung proteasomaler Substrate durch den SCF^{Fbxo7}-Komplex?
6. Oder dienen PI31 und V3 als Modulatoren von Fbxo7, indem sie z. B. dessen Homodimerisierung beeinträchtigen und damit die Erkennung oder Ubiquitinierung von Substraten beeinflussen?

In Zusammenhang mit der ersten Frage steht natürlich auch der noch ungeklärte Nutzen einer Induktion von PI31 durch virale Infektionen. Ob sich dabei eine antivirale Funktion von PI31 offenbart oder evtl. ein Mechanismus von Viren, der Immunantwort zu entkommen, bleibt weiterhin ein spannendes Thema.

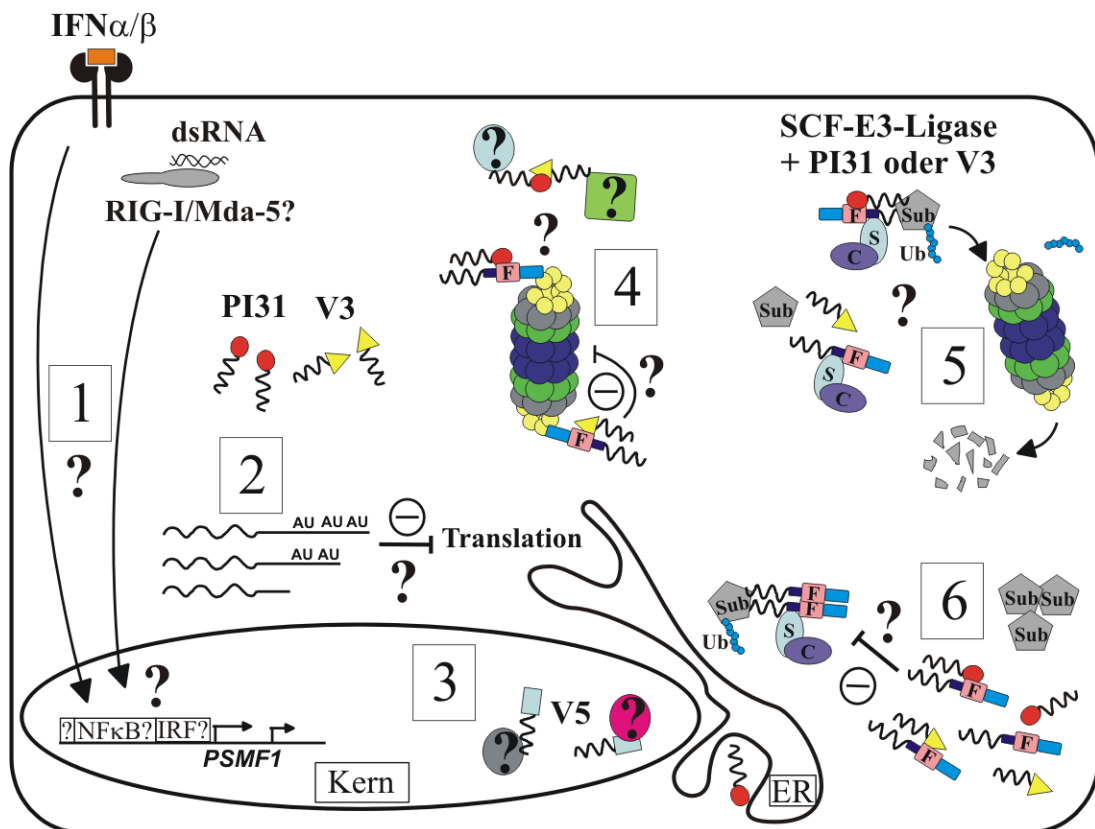


Abbildung 3.5: Modellhafte Darstellung der sich aus den Ergebnissen dieser Arbeit ergebenden neuen Fragestellungen zur Regulation und Funktion von humanem PI31. [1] Sind die dsRNA-Rezeptoren RIG-I/Mda5 für die Induktion von PI31 durch dsRNA verantwortlich und welche Transkriptionsfaktoren binden im Promotor von *PSMF1*? [2] Welche regulatorischen Elemente (AU) in der 3'UTR von PI31 inhibieren die Expression? [3] Welche Funktion haben die PI31-Isoformen, speziell V5 als Kernvariante? [4] Interagieren PI31 und V3 über Fbxo7 indirekt mit dem Proteasom bzw. 19S Regulator und könnte das der Grund der Inhibition durch V3 sein? [5] Tragen PI31 und V3 zur Erkennung von proteasomalen Substraten (Sub) durch Fbxo7 und deren Ubiquitinierung (Ub) durch den SCF-Komplex bei? [6] Oder sind PI31 und V3 Modulatoren von Fbxo7, indem sie z. B. dessen Dimerisierung beeinträchtigen und dadurch die Erkennung oder Ubiquitinierung von Substraten beeinflussen?

Kapitel 4

Anhang

V1	MAGLEVLFASAAPAITCRQDALVCFLHWEVVTHGYFGLGVGDQPGPNDKKSELLPAGWNN	60
V5	-----MPKKLGPKSQR	21
V6	-----MPKKLGPKSQR	21
V1	NKDLYVLRYEYKDGSRKLLVKAITVESSMILNVLEYGSQQVADLTNLDDYIDAEHLGDF	120
V5	QRGAVAPLTQVQQAACSPTYKQAKRNARSYQGRRRRRRCSQNTTSRVPSQLQAVDSSSAS	71
V6	QRGAVAPLTQVQQAACSPTYKQAKRNARSYQGRRRRRRCSQNTTSRVPSQLQAVDSSSAS	71
V1	HRTYKNSEELRSRIVSGIITPIHEQWEKANVSSPHREFPPATAREVDPLRIPPHHPHPTSR	180
V5	QRTYKNSEELRSRIVSGIITPIHEQWEKANVSSPHREFPPATAREVDPLRIPPHHPHPTSR	131
V6	QRTYKNSEELRSRIVSGIITPIHEQWEKANVSSPHREFPPATAREVDPLRIPPHHPHPTSR	131
V1	QPPW-----CDPLGPFVVGGE	196
V5	QPPW-----CDPLGPFVVGGE	147
V6	QPPCCFRRNEFGLDCSKNKEMNLAWIAPNTGLNTVQQWSRNRGDDTMGCDPLGPFVVGGE	191
V1	DLDPFGPRRGMIVDPLRSGFPRALIDPSSGLPNRLPPGAVPPGARFDPFGPIGTSPPGP	256
V5	DLDPFGPRRGMIVDPLRSGFPRALIDPSSGLPNRLPPGAVPPGARFDPFGPIGTSPPGP	207
V6	DLDPFGPRRGMIVDPLRSGFPRALIDPSSGLPNRLPPGAVPPGARFDPFGPIGTSPPGP	251
V1	NPDHLPPPGYDDMYL	271
V5	NPDHLPPPGYDDMYL	222
V6	NPDHLPPPGYDDMYL	266

Abbildung 4.1: Aminosäuresequenzvergleich der PI31-Isoformen V5 und V6 mit PI31 (V1). Sequenzunterschiede zu PI31 wurden grau unterlegt, rot hervorgehoben sind die potentiellen GYF-Bindungsmotive und fett die Kernlokalisierungssequenz von V5 und V6; Vergleich von V2, V3 und V4 mit PI31 siehe Seite 20, Abb. 2.9.

A	V1	MAGLEVLFASAAPAITCRQDALVCFLHWEVVTHGYFGLGVGDQPGPNDKKSELLPAGWNN	60
	V7	MAGLE-----PGPNDKKSELLPAGWNN	22
	V8	MAGLE-----PGPNDKKSELLPAGWNN	22
	V10	MAGLE-----PGPNDKKSELLPAGWNN	22
	V1	NKDLYVLRYEYKDGSRKLLVKAITVESSMILNVLEYGSQQVADLTNLDDYIDAEHLGDF	120
	V7	NKDLYVLRYEYKDGSRKLLVKAITVESSMILNVLEYGSQQVADLTNLDDYIDAEHLGDF	82
	V8	NKDLYVLRYEYKDGSRKLLVKAITVESSMILNVLEYGSQQVADLTNLDDYIDAEHLGDF	82
	V10	NKDLYVLRYEYKDGSRKLLVKAITVESSMILNVLDLQEQ-----	61
	V1	HRTYKNSEELRSRIVSGIITPIHEQWEKANVSSPHREFPPATAREVDPLRIPPHPHPTSR	180
	V7	HRTYKNSEELRSRIVSGIITPIHEQWEKANVSSPHREFPPATAREVDPLRIPPHPHPTSR	142
	V8	HRTYKNSEELRSRIVSGIITPIHEQWEKANVSSPHREFPPATAREVDPLRIPPHPHPTSR	142
	V10	-----	
	V1	QPPWCDPLGPFVVGGEDLDPFGPRRGMIVDPLRSGFPRALIDPSSGLPNRLPPGAVPPG	240
	V7	QPPWCDPLGPFVVGGEDLDPFGPRRGMIVDPLRSGFPRALIDPSSGLPNRLPPGAVPPG	202
	V8	QPPWCDPLGPFVVGGEDLDPFGPRRGMIVDPLRSGFPRALIDPSSGLPNRLPPGAVPPG	202
	V10	-----	
	V1	AFDPPFGPIGTSPPGPNPDHLPPPGYDDMYL	271
	V7	AFDPPFGPIGTSPPGYVVTQT-----	223
	V8	AFDPPFGPIGTSPPGPNPDHLPPPGYDDMYL	233
	V10	-----	

B	V1	MAGLEVLFASAAPAITCRQDALVCFLHWEVVTHGYFGLGVGDQPGPNDKKSELLPAGWNN	60
	V9	MAGLEVLFASAPAITCRQDALVCFLHWEVVTHGYCGLGVGDQPGPNDKKSELLPAGWNN	60
	V1	NKDLYVLRYEYKDGSRKLLVKAITVESSMILNVLEYGSQQVADLTNLDDYIDAEHLGDF	120
	V9	NKDLYVLRYEYKDGSRKLLVKAITVESSMILNVLEYGSQQVADLTNLDDYIDAEHLGDF	120
	V1	HRTYKNSEELRSRIVSGIITPIHEQWEKANVSSPHREFPPATAREVDPLRIPPHPHPTSR	180
	V9	HRTYKNSEELRSRIVSGIITPIHEQWEKANVSSPHREFPPATAREVDPLRIPPHPHPTSR	180
	V1	QPPWCDPLGPFVVGGEDLDPFGPRRGMIVDPLRSGFPRALIDPSSGLPNRLPPGAVPPG	240
	V9	QPPWCDPLGPFVVGGEDLDPFGP-----	203
	V1	AFDPPFGPIGTSPPGPNPDHLPPPGYDDMYL	271
	V9	-----NPDHLP-----	218

Abbildung 4.2: Aminosäuresequenzvergleich der PI31-Isoformen mit PI31 (V1). (A) V1, V7, V8 und V10, (B) V1 und V9; Sequenzunterschiede zu PI31 wurden grau unterlegt, rot hervorgehoben sind die potentiellen GYF-Bindungsmotive.

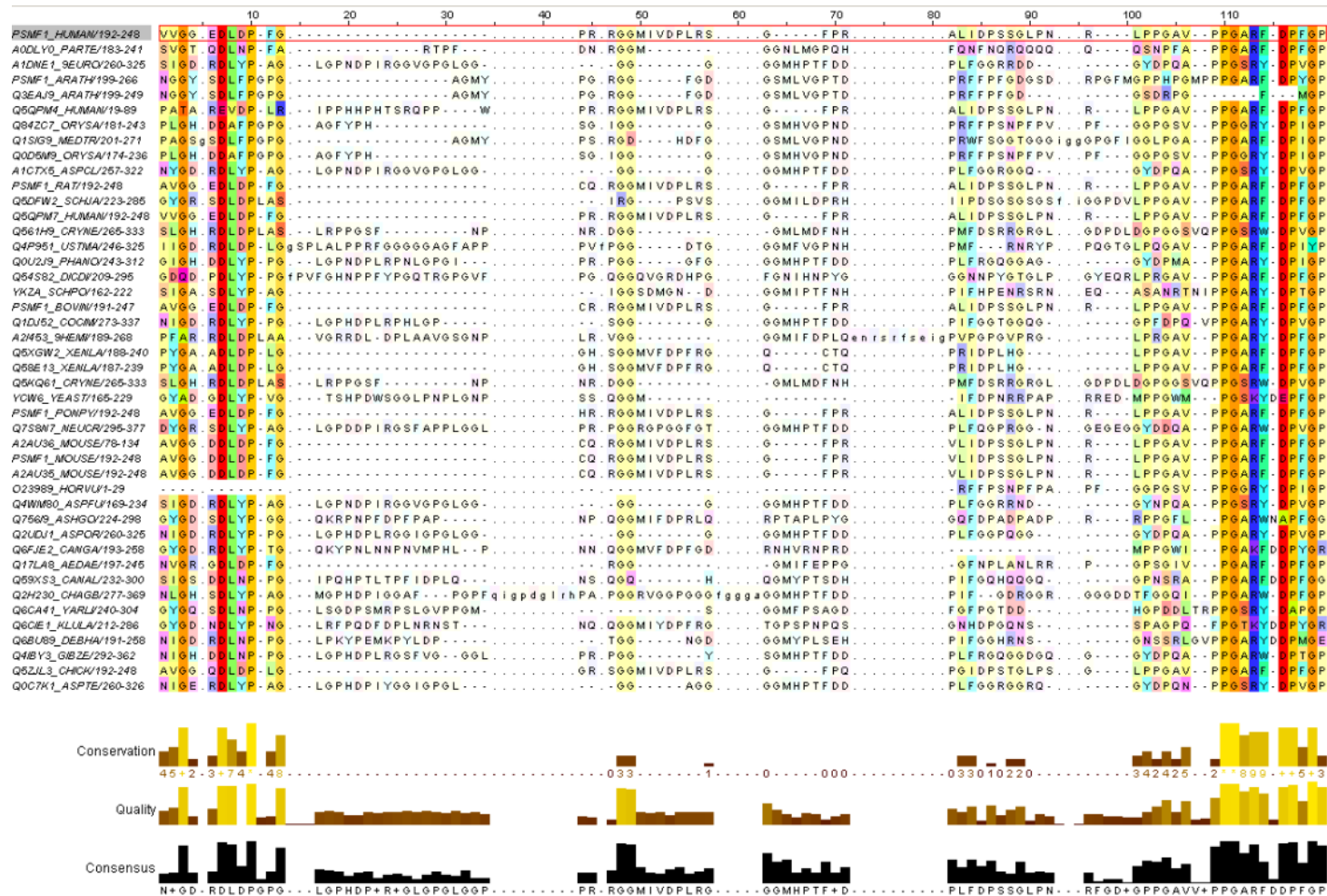
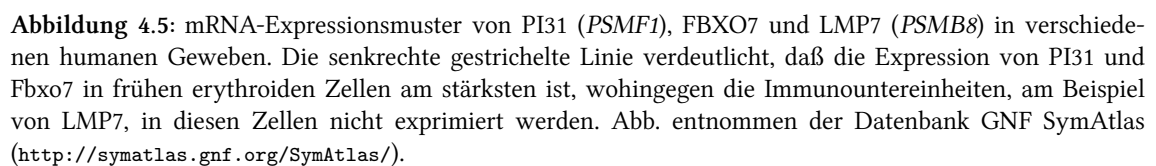


Abbildung 4.3: Aminosäuresequenzvergleich von 44 PI31-Domänen (PI31_Prot_Reg) aus Proteinen von 37 Spezies, zur Veranschaulichung der konservierten Reste; entnommen der Proteinfamiliendatenbank Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>).

3'UTR der mRNA von hPI31

AGGCCTCAAGAATGTAACATCCCAGGCT
 TCCCTCCATTCTCTGGAGCTGCCACCGCTGTCCCCATCAGCAACCATGTTCTTGACGGC
 TGGGGGCAAGGATTCTGCTCATGTGTTTGCAGACCGGCTGGGATAGCCTCCCCACCCCT
 TATCAGAGCCAAGACACCTGCTGCAGCTCTCCACCTAGCTGCAGATAGCTCCCAAAGAGA
 AATCAGTGTGTCTCTTTCACCATCAGCTCCTCCCCCTTTCACCACCAGCTCCTCTCCACTT
 CCCAAGGGAGACTCCGGCAACCTTCAGCAACATATATCCTCGACCAGATGCAGTGTATATA
 AGAACAGAACGCATTTTGGATGTTATTATTAAGAACCAATGTCAATACA GAATTCATGT **A1 (~380bp)**
 TGCCGGTTTCCCACTTTTCTTTTACATTAATGCATAGCTGCTTCCATTTA TGAGACTTT
 AGAGTTTGAGTTTCTGTAGGGCTGAATGACTCTTTTCTGCCCAGGGCCCATCTTGCT
 TCTCAGGCACCTTCCGTTTATTAATTGCCATTGCTCCTGACATCACTAAGATGGGTCCC
 TTCTGGCTGCATGAATGGAATGAGTGACTGGAAATCCCATAGGCCACAAGAATGACTTT
 CACAGGGCAGGAACATTGTGAAAGACTGCATCATTTCTGATGAGGCAAAATCCTCCAGC
 TATTCCTGTCTGGGCCAGTTTGTAGGTCCATCTGTGATGGGCAGCAGTAGTCAAAAAG
 CCAAGGAAAAACAGAGCAGACCTGAAGGCTAATCTTATTTTGGCCATAACTTAGTGAA
 TGACCCTAAGCAAGTTCCTCTCCTCTTAGGGCCTTGTGCCAAGCCTATGAAATTGGAGG
 TGGCTTTCCTGCTCTAAAGCATTTTGATGCTCATCTCTGTGTTTGGTAACCCCTATAAAC
 TGGGGCAGAGGAAAGAATGATGGTTCAAGGCCATACTTCCCTTGAACCTTGTGTGGTTC
 TTGCCATAACTCTGTGTTTGGACCCCATGGGGCCAGACAGAGCAGGAGCATGGGC
 TGCTCTGAGTGTGGTGTGAACCTCGGGAGGAGCAGGGAGCCCTGCACCTTGTGTCTG
 GCCACCTGACCTTGGGTGTCTCCGGATCCTTTTCAGCCCGAGGCTGACAGACGCGGG
 CAGTGATGAGCCCTGTCTGGAGTGGAAAGACGATAGAGCACCAGGCTAAGAGGCAC
 GAGATCAAGCGGTAGTCACTTCCGCTCTGCAGCTAGCATTTCAACCATATGTGGATCCT
 TTCATTTCTCAGCTCCCTGGATTCTTCCCTAAATTAGGACCTATTATTTA CCTGTAGG
 TAAGCAAGTACTGTAGCTCTTCTGAGGTATCTGCCAGGCTGTTTTCTGTAGCCTCAGAT
 TGCCTATCTGCTTAGCCTGAGAACAGGTAGATGAAA ACTAAA CTGATGCCTAGGCCCAGG **A2 (~1400bp)**
 GTCAGTCTCAGATGGAAGCTGGGCTGGGTGGGGAGGCTAGCATGCGTGGCTCCCTGGGT
 ATTTCTGTGAGTCCCATGGCAAGCAGTGATTA GTAAACACCCAGAGTCAGGGGAAGC
 CAACCACCTTGAACCTTTAGAACATCTCTGCTTTGGAGAAAGACCCAGAGATCAGGCAG
 AGGTGCAGATTTCAATCACTACTCATAACCTTTGAGAGATGGCAAAATGGGAGGAGTGTAG
 TCTTTGTTTGAATTTGACCATTTCTGCAACCAAAAGGACTTAGAGCAGTTTGCTCATA
 AAGCATCTCTTATATATAAAGGAAGTATTA AAGGATGATAGAGACCATCAGATAGAAAG
 CAGGAAGGTA GATAACTTTTAGGACCTTGATGTGAGGAAAAGATAAA ATTTAAAC AATA **A3 (~1800bp)**
 AATTGGCCACTTAGATTTTCTAGCAGCAAGTCCGAAAAGATAGTTATATACAAAATTCT **A4 (~1900bp)**
 GTTTCTGAAAACAAAATTGTGATTCACCTTCAGAAATTGGCCATTTTTTTTGTGAGTTTC
 CTTGCATCAAGGACTGAGAAACACAGTCATTGTCTTAGTGTTCTATGGGAGGAAGTG
 AATAGAGCCTTTAGGAACCTCCTGGTCAAGCTTATGGTGCTTATTTTGATCTGGGCCACT
 TCCCTCCTTCCAGTCATGAGTAATCATCAAGGAGCAAGTTGGAGTGTTCAGGTGTATAT
 TTTGTAGAACCACAAAGATTGGAGCCTTAAC AATAAA CATCAGCACTAAGTGACCTGTTT **A5 (~2200bp)**
 CTCTTTTTTAAATAGCAGCTTTATTGAGATATA ATTTA CATACCCATA ATTTA CATACC
 TGTTTAAGTATACAATTCAAGTGATTTA GTATGTTCAAGTGTTCACATCCACCACCA
 TTTCTAATTCCTGAACATTTTCACCACCTCAAAAAGAAACACACCCATTGGCATGAC
 TCCCATTCCTTGTCTCCAGCCCCAGGCAACCACTAACATCTGTCTCTAAAGATTTTTT
 TTTTTTTCTGGACAGTTCTCATAAGTGGAATCACTCAGTATTATGGCCTTTTGTGTCTG
 GCTTCTTTTCATTTTCATGTGATGTTTCAAGATTCAATTCATGCTGATGATGATCATG
 TATGGATATATCACATTTTGTCTATCC TTTTATCAGTTGATGGACAGTTGGGTTGTTTCT
 ACAAAAAGGCTATTATGAGTAATGCAGCCAAGAACATTTGTGTACCAAGTTTGTAGTTT
 CAGTTGTTTGTGATTTTCAGTGTCTTTCAGTTCAATTTGGGTATATACCAAGGAGTGGAAATG
 CTGTTTCACATGGTAGCTCTATATTCTACTTTGTGAGGAATTGTCAGACTGTTTTCCACG
 GAAGCTGCACCATTTTACATTTCCACTGGTA ATTTA TGAGGGTTCCAGTTTCCCCACATC
 TTCACCACTCTTGTATTTTTCATGCTTATGGCCATCCTAGTTAGCGTGAAGTAGCATC
 TCATTGTGGTCTTCTTCCAT TTTTAA AAGAATTTTGACCTACACCAAGCAAGGCA
 GAGACCAGAGTCAGTCCCCCTGGGGAGCAATCTGTGGTTTGTATAATCACCACCTGGG
 ATGAACATGGCTGGTGAGCTGCAGAGCAGTTGATTTGACTTTTGGGGATGGTTCTAGGCT
 GGATGTGATACAGGGCAGGTTTGTCTCTAGAGAAAGTTTCATGACCTTCAGGTCTAAT
 GAGATTCAGATCATCACTTTGGTTTGGTTTGAATTTCTTTGTTTATCCAGTGAATTACA
 AGTAG AATAAG ATCTGTTCTAAATTGTC **A6 (~3300bp)**

Abbildung 4.4: Sequenz der 3'UTR der PI31-mRNA. Fett und unterstrichen sind die sechs potentiellen poly(A)-Signale A1–A6 und in Klammern die jeweils resultierende Länge der 3'UTR; rot hervorgehoben wurden potentielle regulatorische mRNA-Elemente (Yang et al., 2003), wobei die AREs (Klasse I) unterstrichen sind, sowie die Konsensussequenz des cytoplasmatischen poly(A)-Elements (Mendez und Richter, 2001) kursiv gesetzt wurde. Der eingegrenzte Sequenzabschnitt umfaßt die ca. 1200bp, die in der 3'UTR der Spleißvariante V2 fehlen.



Kapitel 5

Material und Methoden

Diese Arbeit wurde mit L^AT_EX 2_ε in T_EXnicCenter 1.0 *Stable Release Candidate 1* (MikT_EX 2.7) erstellt. Die Schrift ist LinuxLibertine vom *Libertine Open Fonts Project*.

5.1 Zellkultur

5.1.1 Zelllinien und Medien

Vollmedien:

BASAL ISCOVE's Medium + 100U/ml Penicillin, 100μg/ml Streptomycin, 2mM L-Glutamin und 10% FCS

RPMI 1640 Medium + 100U/ml Penicillin, 100μg/ml Streptomycin und 10% FCS (BIOCHROM AG)

Zusatz von 1mg/ml Geneticin (G418; Invitrogen) zum Vollmedium für stabile Transfektanten.

Zelllinie	Zelltyp	Vollmedium	Bemerkung
HeLa	Zervixepithelcarcinom	Basal Iscove's	
T2	Derivat der Lymphoblastoidlinie 174	RPMI	
U373	Glioblastom/Astrocytom-Zelllinie	Basal Iscove's	
DU145	Prostatakrebszelllinie	Basal Iscove's	
T2 2/7	T2, stabil transfiziert mit LMP2 u. LMP7	RPMI+G418	Kuckelkorn et al. (1995)
HeLa-CD3δ	HeLa, stabil transfiziert mit CD3δ (Klon 42)	Basal Iscove's+G418	AG Kloetzel

Tabelle 5.1: Verwendete humane Zelllinien und die dazugehörigen Kulturmedien; für die stabilen Transfektanten T2 2/7 und HeLa-CD3δ wurden die Hersteller mit angegeben.

Die Lysate von SKNEB- und LN18-Zellen stammen von Dagmar Siele (AG Kloetzel) und die Lysate von HEK293-, HUVEC- und RKO-Zellen aus dem Labor Elke Krüger (AG Kloetzel). Von Alexander Kloß (AG Kloetzel) wurden mir freundlicherweise die Lysate von zwei humanen Gehirnen (G1 u. G2) zur Verfügung gestellt.

5.1.2 Plasmid-Transfektion von HeLa-Zellen

Die Transfektion von HeLa-Zellen mit Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe von Lipofectamin 2000 (Invitrogen) nach Herstellerangaben. Abweichend vom vorgegebenen Protokoll wurde statt der angegebenen Reagenzmenge ein Verhältnis von 1:1 (μg DNA : μl Lipofectamin) eingesetzt. Die Transfektion erfolgte für 16–20h über Nacht oder für 2–8h über Tag.

5.1.3 Immunfluoreszenz

10x PBS: 80g NaCl, 2g KCl, 14,4g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2g KH_2PO_4 ad 1l H_2O , pH 6,63 mit HCl einstellen, autoklavieren

Permeabilisierungs-/Block-/Waschpuffer (PBW): 1x PBS, 1% BSA, 0,1% Saponin, 0,1% NaN_3

Paraformaldehyd (PFA): 3,7% (w/v) in PBS

DAPI-Lösung: $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 4',6-Diamidino-2-phenylindol in PBW-Puffer

HeLa-Zellen wurden in 24well-Platten auf Deckgläschen kultiviert. Nach dem Absaugen des Mediums und eines Waschschrilles mit PBS wurden die Zellen mit 3,7% PFA für 10min fixiert. Es folgten zwei Waschschrille mit PBS und der Permeabilisierungs- und Blockierungsschritt für 2x 5min mit PBW-Puffer. Die Zellen wurden mit dem Primärantikörper (in PBW-Puffer) für 1h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschrillen mit PBW-Puffer folgte die Inkubation mit dem Zweitantikörper (1:1000 in PBW-Puffer) für 1h. Es wurde daraufhin zweimal mit PBW-Puffer gewaschen und die Zellen für 5min mit DAPI-Lösung inkubiert. Nach zwei Waschschrillen mit PBS wurden die Zellen mit *Shandon Immu-Mount* (Thermo Scientific) eingebettet. Die Aufnahmen wurden mit einem Leitz DMRD Mikroskop von Leica gefertigt.

5.2 Molekularbiologische Methoden

Alle angewandten molekularbiologischen Standardmethoden wurden in Tabelle 5.2 zusammengefaßt. Die Anwendung erfolgte entweder nach den Herstellerangaben der Kits oder nach der Methodensammlung von Sambrook et al. (1989).

RNA-spezifische Methoden	Kit/Bemerkung
Isolierung von Gesamt-RNA	<i>High Pure RNA Isolation Kit</i> (Roche)
Konzentrationsbestimmung von DNA/RNA	OD _{260nm} , Sambrook et al. (1989)
denaturierende RNA-Gelelektrophorese	Sambrook et al. (1989)
Northernblot	<i>VacuGene XL Vacuum blotting System</i> , <i>VacuGene XL</i> Protokoll Nr.4 (GE Healthcare)
Herstellung von DIG-markierten RNA-Sonden	<i>DIG RNA Labeling Mix</i> (Roche) siehe Tabelle 5.3
cDNA-Synthese (Reverse Transkription)	<i>Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit</i> (Roche)
DNA-spezifische Methoden	
Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	<i>FastStart High Fidelity PCR System (dNTPack)</i> (Roche) <i>Pwo SuperYield DNA Polymerase (dNTPack)</i> (Roche) Primer siehe Tabellen 5.5, 5.6, 5.7
Reinigung von DNA	<i>GFX-PCR DNA and Gel Band Purification Kit</i> (GE Healthcare)
DNA-Agarosegelelektrophorese	Sambrook et al. (1989)
Restriktionsverdau	Enzyme von NEB/Fermentas, Sambrook et al. (1989)
<i>Fill-In</i> Reaktion	Klenow-Fragment (NEB), Sambrook et al. (1989)
Dephosphorylierung	SAP (Roche), Sambrook et al. (1989)
Ligation	T4-Ligase (NEB), Sambrook et al. (1989)
TOPO-Ligation	TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen)
Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	QIAprep Spin Miniprep Kit, Plasmid Maxi Kit (QIAGEN)
Transformation von <i>E.coli</i> mit Plasmid-DNA	Hitzeschockmethode, Sambrook et al. (1989)

Tabelle 5.2: Angewandte molekularbiologische Standardmethoden mit Angabe der genutzten *Kits* und Hersteller (NEB=New England Biolabs; SAP=shrimp alkaline phosphatase).

5.2.1 Hybridisierung und Detektion der RNA-Sonden

Name	5'-3'-Sequenz	Sonde
31R	<i>TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGT</i> AAG GCT CCA ATC TTT TGG GTT CTA C	S3
35R	<i>TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC</i> ATT GAG GAT CAT GCT GCT CTC C	S1

Tabelle 5.3: Ankerprimer für die PCR-Amplifizierung der DNA-*Templates* für die Sonden S1 und S3, der T7-Promotor ist kursiv hervorgehoben. Die Amplifizierung des S1-*Templates* erfolgte mit der Primerkombination 17F/35R und des S3-*Templates* mit 30F/31R (s. auch Tab. 5.7). Die Herstellung der DIG-markierten RNA-Sonden erfolgte nach den Herstellerangaben des *DIG RNA Labeling Mix-Kits* mittels T7-Polymerase (Roche).

20x SSC: 3M NaCl, 0,3M Natriumcitrat, pH 7,0 in DEPC-H₂O, autoklavieren

Hybridisierungslösung: 5x SSC, 7% SDS, 0,1% N-Laurylsarcosin (SIGMA), 1% Puffer 2, autoklavieren und anschließend Zugabe von 50% Formamid

Waschpuffer A: 2x SSC, 0,1% SDS, in DEPC-H₂O

Waschpuffer B: 0,2x SSC, 0,1% SDS, in DEPC-H₂O

Puffer 1: 0,1M Maleinsäure pH 7,5, 150mM NaCl, autoklavieren

Block-Stammlösung: 10% *Blocking Reagent for nucleic acid hybridization/detection* (Roche) in Puffer 1

Puffer 2: 1% Blocklösung in Puffer 1

Puffer 3: 100mM Tris HCl pH 9,5, 100mM NaCl

Nach erfolgtem Transfer der RNA auf eine Nylonmembran (Roche) durch Northernblot, wurde zum Blocken der Membran diese mit Hybridisierungslösung rotierend für 1h bei 68°C inkubiert. Die Hybridisierung der DIG-markierten RNA-Sonden (Verdünnung 1:1000) erfolgte rotierend bei 68°C über Nacht. Die Membran wurde daraufhin bei 68°C zweimal je 5min in Waschpuffer A und zweimal je 15min in Waschpuffer B gewaschen. Nach Äquilibrierung der Membran in Puffer 1 für 1min und 30min Blocken in Puffer 2 bei Raumtemperatur wurde die Membran mit einem DIG-spezifischen Antikörper, gekoppelt an Alkalische Phosphatase (Roche; Verdünnung 1:10000 in Puffer 2) für 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgten zwei Waschschrte von 15min mit Puffer 1 und eine Inkubation mit Puffer 3 für 1min. Als Substrat für die Alkalische Phosphatase diente CDP-Star, *ready to use* (Roche). Nach 5minütiger Inkubation der Membran in der Substratlösung, wurden die Chemilumineszenz-Signale durch Belichtung von X-OMAT UV *Scientific Imaging* Filmen (KODAK) detektiert.

5.2.2 Klonierung der verwendeten Plasmide

Die in dieser Arbeit hergestellten und genutzten Expressionskonstrukte oder sonstige DNA-Plasmide wurden in Tabelle 5.8 aufgelistet, mit Informationen zu den Klonierungsschnitt-

stellen und etwaigen Besonderheiten. Die Amplifizierung der Inserts für die Expressionsplasmide V1, V2, V3, V4 u. V5 sowie für pEGFP-V5 erfolgte mit Hilfe der in Tabelle 5.5 angegebenen Primer bzw. Primerkombinationen. Die PCR-Produkte wurden daraufhin entweder direkt mit den angegebenen Restriktionsenzymen geschnitten, oder es erfolgte eine Subklonierung in den pCR2.1-TOPO-TA Vektor (Invitrogen) mit anschließendem Restriktionsverdau. Es folgte die Ligation der geschnittenen Inserts in die *multiple cloning site* (MCS) des pcDNA3.1 (Invitrogen) bzw. pEGFP-N3 Vektors (Clontech). V1 und V5 wurden außerdem ohne Stopcodon (Primer V1=H45F/42R; V5=40F/42R) in den pcDNA3.1-myc/His B Vektor (Invitrogen) ligiert, um eine C-terminale myc/His-Markierung zu erhalten.

Für die Amplifizierung der Promotorsequenzen aus genomischer HeLa-DNA sowie der 3'UTR-Sequenzen aus HeLa-cDNA wurden die in Tabelle 5.6 angegebenen Primerkombinationen verwendet. Nach dem Restriktionsverdau mit den entsprechenden Enzymen erfolgte die Ligation der Promotorabschnitte in die MCS des Reportergenplasmides pCAT3 *basic* (Promega). Für die Klonierung der CAT-Reportergenkonstrukte mit 3'UTR wurde das vek-

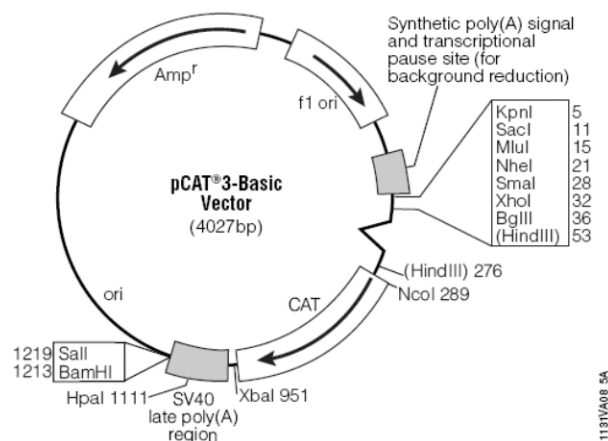


Abbildung 5.1: pCAT3 *basic* Vektorkarte (Promega). Die Box mit acht Schnittstellen (KpnI, SacI etc.) stellt die MCS dar, nach dem CAT-Gen ist die SV40-poly(A) Region als schattierte Box hervorgehoben, an derer Stelle die 3'UTR von PI31 bzw. V2 eingefügt wurde.

torinterne SV40-poly(A)-Signal hinter dem CAT-Gen mit XbaI/BamHI herausgeschnitten und die entsprechenden 3'UTR-Sequenzen mit den kompatiblen Schnittstellen SpeI/BclI eingefügt (siehe pCAT-Vektorkarte 5.1). Durch die Ligation wurden die Schnittstellen zerstört. Für das CAT-Reportergenkonstrukt pCAT-6 (siehe S. 30 Abb. 2.22) wurde im Nachhinein das SV40-poly(A)-Signal wieder hinter die 3'UTR kloniert. Dafür wurde eine am Ende der 3'UTR intern gelegene BclI-Schnittstelle für eine Doppelblunt-Ligation genutzt.

5.2.3 Generierung von doppelsträngigen DNA-Oligonukleotiden

Annealing-Puffer: 10mM Tris/HCl (pH 8,0), 50mM NaCl, 1mM EDTA

Die Erzeugung von PI31- und V5-Expressionsvektoren mit einem N-terminalen myc-Tag erfolgte durch das direkte Einfügen von doppelsträngigen Oligonukleotiden mit der entsprechenden myc-Tag Sequenz (Tab. 5.4) in die schon vorhandenen pcDNA3.1-Expressionskonstrukte von PI31 und V5 (siehe Tabelle 5.8). Auf die gleiche Weise wurde auch das letzte natürliche PI31-poly(A)-Signal (A6 innerhalb der letzten 60 Basen) der 3'UTR in das Promotorkonstrukt pCAT-1,5+5'UTR (pCAT-1) als Ersatz für das SV40-poly(A)-Signal kloniert (pCAT-7) (Tab. 5.8).

Von den jeweiligen *sense* und *antisense* Oligonukleotiden ($10\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in H_2O) (siehe Tabelle 5.4) wurde je $1\mu\text{l}$ in $18\mu\text{l}$ *Annealing*-Puffer verdünnt und im PCR-Cycler mit folgendem Programm hybridisiert:

95°C, 2min
Kühlrate 0,02°C/sec
auf 25°C, 1min
auf 4°C, Pause

Die Oligonukleotide wurden so entworfen, daß nach Hybridisierung spezifische 5'-Überhänge am 5'- und 3'-Ende entstehen, durch die eine direkt Klonierung in den vorher entsprechend geschnittenen Zielvektor möglich wurde. Im Falle der myc-Oligonukleotide handelt es sich 5' um eine NheI- und 3' um eine XbaI-Stelle. Für die poly(A)-Klonierung wurde 5' eine SpeI- und 3' eine BclI-Stelle gewählt.

Name	5'-3'-Sequenz
Myc-V1.For	CTA GCG CCA CCA TGC ATA CCG AAC AAA AAC TCA TCT CAG AAG AGG ATC TGC ATA AT
Myc-V1.Rev	CTA GAT TAT GCA GAT CCT CTT CTG AGA TGA GTT TTT GTT CGG TAT GCA TGG TGG CG
Myc-V5.For	CTA GCG CCA CCA TGC ATA CCG AAC AAA AAC TCA TCT CAG AAG AGG ATC TGC ATA AAT
Myc-V5.Rev	CTA GAT TTA TGC AGA TCC TCT TCT GAG ATG AGT TTT TGT TCG GTA TGC ATG GTG GCG
polyA-For	CTA GTG TTT GAA ATT TCT TTG TTT ATC CAG TGA ATT ACA AGT AGA ATA AAG ATC TGG TTC T
polyA-Rev	GAT CAG AAC CAG ATC TTT ATT CTA CTT GTA ATT CAC TGG ATA AAC AAA GAA ATT TCA AAC A

Tabelle 5.4: Doppelstrang-Oligonukleotide mit myc-Tag bzw. poly(A)-Signal für die direkte Ligation in die geschnittenen Vektoren pcDNA3.1(V1) u. (V5) bzw. pCAT-7; der myc-Tag sowie das poly(A)-Signal (AA TAAA) wurden kursiv hervorgehoben.

Bezeichnung	5'-3' Sequenz	Bemerkung	Primerkombination für PCR
H45F	GCG AAG CTT GCC ACC <u>ATG</u> GCG GGC CTG GAG GTA	Start von V1-4 mit HindIII+Kozak	V1, V3=H45F/H46R; V2=H45F/36R; V4=H45F/37R
H46R	CGC GAT ATC <u>TCA</u> CAG GTA CAT GTC ATC GTA GCC	Stop von V1, V3 u. V5 mit EcoRV	
36R	CGC GAT ATC CCA GAA CAG GGC TCA <u>TCA</u> CTG	Stop von V2 mit EcoRV	
37R	CGC GAT ATC <u>CCT</u> CAC TGT TCT TGT AGG TCC AGC AC	Stop von V4 mit EcoRV	
40F	TCG CGG CTA GCG CCA CCA TGC CTA AGA AGC TTG GGC C	Start von V5 mit NheI+Kozak	V5=40F/H46R
42R	GGG GTA CCC AGG TAC ATG TCA TCG TAG C	V1, V5 ohne Stop mit KpnI für EGFP-N3 u. pcDNA3.1-myc/His B	V1=H45F/42R; V5=40F/42R

Tabelle 5.5: Verwendete Klonierungs-Primer für die Herstellung von pcDNA3.1 bzw. pEGFP-N3 Expressionsplasmiden; hergestellt von der Firma BioTeZ Berlin-Buch GmbH, die Schnittstellen sind kursiv hervorgehoben, Start- und Stopcodons sind unterstrichen; Endkonzentration im PCR-Ansatz 200nM (F=*Forward*, R=*Reverse*).

Bezeichnung	5'-3' Sequenz	Bemerkung	Primerkombination für PCR
50F	GGG GTA CCA CTA GCT TTG CTG TTG GAC	Beginn 1,5kb-Promotor (<i>PSMF1</i>) mit KpnI	1,5kb-Promotor+5'UTR=50F/52R; 1,5kb-Promotor=50F/53R
51F	GGG GTA CCT CAC AAA GTG CTG GGA TTA	Beginn 1,0kb-Promotor (<i>PSMF1</i>) mit KpnI	1,0kb-Promotor+5'UTR=51F/52R; 1,0kb-Promotor=51F/53R
52R	CTC GAG TGA GCG CCC GCG ACT TCG	Ende 5'UTR, direkt am Start-ATG mit XhoI	
53R	CTC GAG TAG TCC CAA CAG CGG GCG CAA	Ende Promotor, direkt vor TSS mit XhoI	
54F	GGA CTA GTA GGC CTC AAG AAT GTA ACA TCC	Beginn 3'UTR nach Stop von V1 mit SpeI	3'UTR(V1)=54F/56R
55F	GGA CTA GTG CCC TGT TCT GGA GTG GAA AG	Beginn 3'UTR nach Stop von V2 mit SpeI	3'UTR(V2)=55F/56R
56R	GCC TGA TCA TTG AGG AAC CAG ATC TTT ATT C	Ende 3'UTR mit BclI	
57F	GGG GTA CCT TGC GCC CGC TGT TGG GAC	Beginn 5'UTR mit KpnI	5'UTR=57F/52R

Tabelle 5.6: Verwendete Klonierungs-Primer für die Herstellung von pCAT-Reportergenplasmiden; hergestellt von der Firma BioTeZ Berlin-Buch GmbH, die Schnittstellen sind kursiv hervorgehoben; Endkonzentration im PCR-Ansatz 200nM (F=*Forward*, R=*Reverse*, TSS=Transkriptionsstart).

Bezeichnung	5'-3' Sequenz	Bemerkung	Primerkombination für PCR
3F	CTT TCC TCC AGA CGC CGA AGT	in der 5'UTR von <i>PSMF1</i> lokalisiert enthält Stopcodon von PI31, V5, V6, V8-10 enthält Startcodon von V5 intronübergreifend Ex9/Ex12 für V2 intronübergreifend Ex3/Ex6 für V4	PI31=3F/3R; V2=3F/3.3R; V3=3F/41R; V4=3F/3.5R V5=3.1F/3R
3R	CTT GAG GCC TTC ACA GGT AC		
3.1F	GCA ACT CAG ATG CCT AAG AAG		
3.3R	TCT GTC AGG CCT CGG GCC G		
3.5R	CTT GTA GGT CCA GCA CAT TG	Beginn Exon 12 Mitte Exon 12 intronübergreifend Ex8/9 für Sonde S1 für Sonde S3 Stop von V3 inklusive Exon 10 (16bp) TLR3, ~540bp	s. S. 16 Abb. 2.4 s. S. 16 Abb. 2.4 s. S. 16 Abb. 2.4 S1=17F/Ankerprimer 35R S3=30F/Ankerprimer 31R
4R	CCA GAA CAG GGC TCA TCA CTG		
8R	CA(T/G) CTC TCA AAG GTT ATG AGT AAT G		
14F	ACC CTT TTG GGC CTC GGA G		
17F	GGC GTC TCC ATT TTG GTC TCA GGT G	CAT-Enzym, ~500bp RIG-I, ~540bp	CAT=59F/60R RIG-I=64F/65R
30F	CTT TTC AGC CCG AGG CCT GA		
41R	GTT AGG TCT GAG TGA CTA CGT AC		
46F	CAT TAG ATC TGT CTC ATA ATG GC		
47R	CAA ATT CAG GTA CCT CAC ATT G	Xbp1, ungespleißt 442bp, gespleißt 416bp HERPUD-1, ~1000bp Nrf2, ~300bp	Xbp1=46F/47R CAT=59F/60R RIG-I=64F/65R Xbp1=73F/74R HERPUD-1=HERP-F/HERP-R Nrf2=Nrf2-F/Nrf2-R
59F	CCG TTG ATA TAT CCC AAT GGC A		
60R	TGA AAC TCA CCC AGG GAT TG		
64F	CCA GAA TCT TAG TGA GAA TTC ATG		
65R	ATC CTC CAA GTT TCT GAT CTA GAT	GAPDH, ~1000bp	GAPDH=GAPDH-F/GAPDH-R
73F	CCT TGT AGT TGA GAA CCA GG		
74R	GGG GCT TGG TAT ATA TGT GG		
HERP-F	TGT GAA GAG TCC TTC AAA AAT G		
HERP-R	TCA GTT TGC GAT GGC TGG GGG GCC	GAPDH, ~1000bp	GAPDH=GAPDH-F/GAPDH-R
Nrf2-F	CTT CAG CAG CAT CCT CTC CAC		
Nrf3-R	GCC AAG TAG TGT GTC TCC ATA GC		
GAPDH-F	ATG GGG AAG GTG AAG GTC		
GAPDH-R	TTA CTC CTT GGA GGC CAT G		

Tabelle 5.7: Verwendete Primer für die analytische PCR; hergestellt von der Firma BioTeZ Berlin-Buch GmbH, Start- und Stopcodons sind unterstrichen, bezüglich der Exon/Intronangaben siehe S. 14 Abb. 2.2; Endkonzentration der Primer im PCR-Ansatz 200nM (F=*Forward*, R=*Reverse*).

Tabelle 5.8: Verwendete DNA-Konstrukte (siehe Abschnitt 5.2.2 u. 5.2.3); die Spalte „Hersteller“ wurde bei den selbst hergestellten Konstrukten freigelassen; „zerstört“ heißt, die Schnittstelle wurde nach Ligation unbrauchbar.

5.3 Proteinbiochemische Methoden

5.3.1 Antikörpergenerierung und -reinigung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zwei polyklonale Antikörper gegen PI31-Peptide in Auftrag gegeben. Es wurden Peptide des N-Terminus (Kloe390) und des C-Terminus (Kloe384) von PI31 durch das Labor von Dr. Peter Henklein synthetisiert (siehe Tabelle 5.9). Die Immunisierung der Kaninchen wurden von der Firma Pineda–Antikörper-Service durchgeführt. Nach 60, 90 und 120 Tagen Immunisierung wurden die Seren der Tiere auf ihre Immunreaktivität getestet. Bei spezifischer Detektion von PI31 im Westernblot wurde das Kompletts serum weiterverwendet (s. Tab. 5.10).

Bezeichnung	Sequenz
Kloe384	<i>EQKLESEEDLARFDPFGPIGTSPPGPNPDHLPPPGYDDMYL</i>
Kloe390	CDQPGPNDDKKSELLPA

Tabelle 5.9: PI31-Peptide für die Immunisierung von Kaninchen und für die Affinitätsreinigung. Das Peptid Kloe384 enthält die Sequenz des myc-Epitops (schräggestellt).

Affinitätsreinigung

Für die Affinitätsreinigung der Antikörper wurde das *SulfoLink Immobilization Kit* von PIERCE genutzt. Vor der Reinigung wurde das jeweilige Peptid laut Protokoll an die Sulfo-link-Säule kovalent gekoppelt und das Serum sterilfiltriert.

Es wurden 2x 4ml Serum im *Batch*-Verfahren mit der Säule für 45min rotierend inkubiert und daraufhin für 30min stehengelassen. Es folgten zwei Waschschr itte mit PBS (siehe Kit-Protokoll) und dann die Elution mit 2x 8ml 100mM Glycin (pH 2). Die Fraktionen von je 1ml wurden sofort mit 50µl 1M Tris (pH 9) neutralisiert und auf ihren Proteingehalt getestet. Dazu wurde 1µl jeder Fraktion auf eine Nitrocellulosemembran getropft und diese mit Ponceaurot angefärbt. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden danach vereinigt, in einer Amicon Ultra (5000 MW) eingeeengt und in PBS+0,05% NaN₃ umgepuffert. Der gereinigte Antikörper wurde danach aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Peptid	Name pAK	Spezifität	Reaktivität WB/IP/IF	Bemerkung
Kloe384	α C-PI31 (384/2)	PI31, C-Terminus AS 240–271	ja/ja/ja	Affinitätsreinigung
Kloe390	α N-PI31 (390/2)	PI31, N-Terminus AS 41–56	ja/ja/ja	Affinitätsreinigung

Tabelle 5.10: Erzeugte polyklonale Antikörper (pAK) gerichtet gegen humanes PI31.

5.3.2 Zellyse und Proteinisolierung

Lysepuffer für Frier/Tau: 50mM Tris, 5mM MgCl₂, 50mM NaCl, pH 7,5, 0.1% Triton X-100, jeweils frische Zugabe von Complete (*Protease Inhibitor Cocktail*, Roche)

Humane Zellen wurden nach der Ernte mit PBS gewaschen und pelletiert. Das Zellpellet wurde in Lysepuffer aufgenommen und einem dreimaligen Frier/Tau-Zyklus mit flüssigem Stickstoff und bei Raumtemperatur unterzogen. Daraufhin erfolgte eine Zentrifugation für 15min bei 14000rpm, um die Zelltrümmer zu pelletieren. Der Überstand mit dem löslichen Gesamtproteinlysate wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Konzentration bestimmt.

5.3.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte entweder durch einen Bradford-Test mit Hilfe des *Protein Assay Dye Reagent Concentrate* (Biorad) oder durch einen BCA¹-Test mit dem *BCA Protein Assay Kit* (PIERCE) jeweils nach Herstellerangaben. Bei beiden Methoden wurde eine Eichreihe mit BSA² erstellt.

5.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

4 x Trenngelpuffer: 1,5M Tris HCl (pH 8,8), 0,4% SDS

4 x Sammelgelpuffer: 0,5M Tris HCl, (pH 6,8) 0,4% SDS

Acrylamid-Stammlösung: 30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid

Polymerisierung: TEMED (N,N,N,N-Tetramethylethylen-diamin), 10% Ammoniumperoxodisulfat (APS)

6 x SDS-Probenpuffer: 375mM Tris HCl (pH 6,8), 1% SDS (w/v), 30% (v/v) Glycerin, 0,5M DTT, 0,04% (w/v) Bromphenolblau

SDS-Laufpuffer: 25mM Tris HCl, 200mM Glycin, 1% SDS (w/v), pH 8,3–8,5

¹*bicinchoninic acid*

²Bovines Serumalbumin

Die Trennung der Proteine mittels SDS-PAGE erfolgte nach dem diskontinuierlichen Laemmli-System mit Tris-Glycin-Puffern. Als Elektrophoresesystem wurde das *Mighty Small System* SE250 bzw. SE260 (HOEFER) genutzt. Die Acrylamidkonzentration variierte je nach zu trennender Proteingröße zwischen 8 und 15%. Die Stärke der Gele betrug 0,75mm. Für SDS-Gradientengele wurde ein Gradientenmischer genutzt, um aus einer 5%igen und einer 15%igen Trenngellösung ein lineares Gradientengel von 1,5mm Stärke ohne Sammelgel zu gießen.

Die Proteinproben wurden vor Auftragung auf das Gel in 1x Probenpuffer für 5min bei 99°C denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte daraufhin bei einer Spannung von 100 bis 180V bis die gewünschte Trennung erreicht war. Als Größenstandard wurde der *Prestained Protein Marker* von NEB oder der *PageRuler™ Prestained Protein Ladder* von FERMENTAS verwendet.

5.3.5 Western Blot und Immundetektion

semi dry-Transferpuffer: 25mM Tris, 200mM Glycin, 0,1% SDS, 20% Methanol, pH 8,3

Naßblot-Transferpuffer: 13,5 mM Tris, 147 mM Glycin, 20% Methanol (v/v)

5x Amidoschwarz-Stammlösung: 0,1% Amidoschwarz, 45% Methanol, 10% Essigsäure

10x TBS: 0,5M Tris, 1,5M NaCl, pH 7,6

TBS-T Waschpuffer: 1x TBS, 0,5% Tween 20

Blocklösung: 1xTBS, 0,5% TWEEN 20, 2,5% Magermilchpulver (*skim milk*, DIFCO), 0,5mM NaN₃

Stripp-Puffer: 100mM Tris pH 6,8, 2% SDS, 0,8% β -Mercaptoethanol

Nach der SDS-PAGE wurden die Proteine durch Blotten auf eine PVDF-Membran (Millipore) übertragen. Der Transfer erfolgte im sogenannten Halbtrocken-Verfahren (*semi dry*; Blot-Apparatur PEQLAB); für die Detektion von Proteinen größer als 80kDa wurde das Naßblot-System von Biorad verwendet. Es wurde bei einer konstanten Stromstärke von 400mA für 1–2h geblottet.

Der Transfer wurde durch das Anfärben der Membran mit einer Amidoschwarz-Lösung überprüft. Nach dem Entfärben der Membran mit H₂O erfolgte das Blocken unspezifischer Proteinbindungsstellen mit Blocklösung für 30min bis 1h bei Raumtemperatur. Die Inkubation der Membran mit dem primären Antikörper (verdünnt in Blocklösung, siehe Tabelle 5.11) wurde bei 4°C über Nacht durchgeführt. Es folgte ein zweimaliges Waschen mit TBS-T für je 20min und die Inkubation mit dem sekundären Antikörper (verdünnt in Blocklösung, siehe Tabelle 5.12) für 1h bei Raumtemperatur. Nach zwei weiteren Waschschritten mit TBS-T wurde die Bindung der Antikörper mit Hilfe des *ECL Plus Western Blotting Detection Kit* (GE Healthcare) nachgewiesen und durch Belichtung von X-OMAT UV *Scien-*

tific Imaging Filmen (KODAK) dokumentiert. Nach der Detektion wurde die Membran in einigen Fällen gestrippt. Dazu wurde diese mit Stripp-Puffer für 30min bei 60°C inkubiert, danach 5x mit H₂O gewaschen und anschließend erneut geblockt.

Antikörper	Spezifität	Spezies (mAK/pAK)	Verdünnung WB/IF/IP	Herkunft
αC-PI31	PI31, C-Term.	Kaninchen, pAK	1:10000/1:20/ja	AG Kloetzel
αN-PI31	PI31, N-Term.	Kaninchen, pAK	1:5000/1:50/ja	AG Kloetzel
αHERP	HERPUD-1	Kaninchen, pAK	1:20000/-/-	AG Kloetzel
αCD3δ	CD3δ	Kaninchen, pAK	1:50000/-/-	AG Kloetzel
αmyc	Myc-Tag	Maus, mAK	1:1000/-/ja	Dianova
αGFP	EGFP	Maus, mAK	1:1000/-/ja	Babco
αTLR3	TLR3	Maus, mAK	1μg/ml/-/-	Abcam
αN3	β7 (MCP444)	Maus, mAK	-/-/ja	Hendil et al. (1995)
αCalnexin	Calnexin (cl37)	Maus, mAK	1:15000/1:50/-	BD Biosciences
αLaminB1	LaminB1	Maus, mAK	1:2000/-/-	Zymed
α20S	Klon 903, gesamt 20S	Maus, mAK	-/1:100/-	AG Kloetzel
αGAPDH	GAPDH	Kaninchen, pAK	1:80000/-/-	Santa Cruz
α-α6	α6 (MCP20)	Maus, mAK	1:5000/-/ja	Hendil et al. (1995)
α-β5	β5 (MB1)	Kaninchen, pAK	1:4000/-/-	AG Kloetzel
αLMP2	LMP2 (iβ1)	Kaninchen, pAK	1:1000/-/-	AG Kloetzel
αLMP7	LMP7 (iβ5)	Kaninchen, pAK	1:1000/-/-	AG Kloetzel
αUbiquitin	Ubiquitin	Kaninchen, pAK	1:1000/-/-	Dako
αNrf2	Nrf2 (C20)	Kaninchen, pAK	1:500/-/-	Santa Cruz
αp53	p53 (DO-7)	Kaninchen, pAK	1:1000/-/-	Novo Castra Lab.

Tabelle 5.11: Primäre Antikörper (m/pAK = monoklonaler/polyklonaler Antikörper; WB = Westernblot; IF = Immunfluoreszenz; IP = Immunpräzipitation)

Name	Herkunft	Verdünnung	Hersteller
anti-Kaninchen-HRP	Ziege	1:10-20000	DIANOVA
anti-Maus-HRP	Schaf	1:5000	Seramun
anti-Kaninchen-Alexa 568	Ziege	1:1000	Molecular Probes
anti-Maus-Alexa 488	Ziege	1:1000	Molecular Probes

Tabelle 5.12: Im Westernblot und in der Immunfluoreszenz verwendete sekundäre Antikörper (HRP = *horse-radish peroxidase*; Alexa 568 = rot, Alexa 488 = grün)

5.3.6 Coomassiefärbung

Coomassie-Lösung: 0,1 w/v Coomassie Brilliant blue R250, 10% Essigsäure, 30% Methanol

Entfärber: 40% Methanol, 10% Essigsäure in H₂O

Die SDS-Gele wurden mit der Coomassielösung für ca. 1min in der Mikrowelle erhitzt und danach für 10–15min geschwenkt. Nach vollständiger Färbung des Gels erfolgte die gleiche Prozedur mit Entfärber, bis, nach mehrmaligem Wechsel der Lösung, die Proteinbanden gut sichtbar waren.

5.3.7 Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitationen erfolgten aus Gesamtzelllysaten oder aus Gradientenfraktionen. Im Falle von Lysaten wurde insgesamt eine Menge von 150µg Protein mit PBS und 20µg/ml BSA auf 1ml verdünnt und mit 2–3µl Antikörper über Nacht bei 4°C rotierend inkubiert. Bei Immunpräzipitationen aus Gradientenfraktionen wurden meist zwei Fraktionen vereinigt und diese mit BSA (20µg/ml) und dem präzipitierenden Antikörper versetzt. Der Antikörper wurde mit 25µl Protein-G-Sepharose (Bettvolumen) nach einer Inkubation von 1 bis 2h bei 4°C präzipitiert. Gewaschen wurde dreimal mit 2fach PBS, einmal mit PBS und einmal mit H₂O. Zwischen den Waschschritten wurde die Sepharose für 1min bei 4000rpm in der Tischzentrifuge pelletiert und der Überstand abgesaugt. Das Pellet wurde in 50µl 2x Ladepuffer aufgenommen und vor dem Auftragen auf ein SDS-Gel für 5min bei 99°C denaturiert.

5.3.8 Dichtegradientenzentrifugation

Gradientenpuffer: 50mM Tris/HCl (pH 7,5), 50mM NaCl, 5mM MgCl₂

Mittels eines Gradientenmischers wurden lineare 10%–40%ige Saccharosegradienten (aus 10% und 40% Saccharose in Gradientenpuffer) in SW 40-Ultrazentrifugenröhrchen (*Polyallomer Centrifuge Tubes*, BECKMAN) hergestellt und mit ca. 4mg Protein aus Gesamtproteinlysaten überschichtet. Die Ultrazentrifugation erfolgte bei 4°C und 40000rpm für 16h. Anschließend wurde das Gradientenröhrchen mit einer Kanüle am Boden durchstoßen und die Saccharoselösung mit Hilfe einer Durchlaufpumpe in Aliquots je 500–700µl fraktioniert.

5.3.9 Extrahierung von Membranproteinen

Für die Extrahierung von Membran- und membranassoziierten Proteinen wurde das *ProteoExtract Native Membrane Protein Extraction Kit* (M-PEK) von CALBIOCHEM nach Herstellerangaben genutzt.

5.3.10 Vernetzung intrazellulärer Proteine

Die Vernetzungsexperimente wurden mit dem chemischen Vernetzer Dithiobis(succinimidylpropionat) (DSP) von PIERCE durchgeführt. Diese Substanz ist membrangängig und damit in der Lage, Proteininteraktionen in lebenden Zellen zu fixieren. DSP reagiert mit freien Aminogruppen, wobei es zu einer kovalenten Bindung zwischen Proteinen kommt, die in engem räumlichen Kontakt stehen. Die Vernetzung ist reversibel, da DSP eine Disulfid-Brücke beinhaltet und durch DTT oder β -Mercaptoethanol gespalten werden kann.

Vor jedem Experiment wurde eine frische Stocklösung von 20mM DSP in DMSO angesetzt. Die Zellen wurden mit Trypsin abgelöst, gewaschen und das Zellpellet in 1ml PBS aufgenommen. Es folgte die Zugabe des Vernetzers mit einer Endkonzentration von 100 μ M. Die Zellen wurden für 30min bei Raumtemperatur rotierend inkubiert und die Vernetzung hernach mit Tris pH 7,5 (c_{end} =10–20mM) für 15min abgestoppt. Es folgte ein Waschschriff mit PBS und die Lyse der Zellen (siehe 5.3.2).

5.4 Funktionelle Assays

5.4.1 Proteaseassay mit fluorogenen Peptidsubstraten

Substrate: Suc-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC, Z-Leu-Leu-Glu-AMC, Bz-Val-Gly-Arg-AMC (BACHEM, jeweilige Stocklösung 20mM in DMF)

10x TEAD-Puffer: 200mM Tris/HCl pH 7,5, 1mM EDTA, 10mM NaN₃, 10mM DTT

Der Proteasom-Aktivitätstest in Ganzzellysaten wurde mit fluorogenen Substraten bei einer Endkonzentration von 20 μ M in 1x TEAD-Puffer durchgeführt. Die Bestimmung erfolgte in Dreifachansätzen mit gleichen Lysatvolumina und späterer Normierung auf die Proteinkonzentration. Die fluorogene Gruppe AMC wurde bei einer Wellenlänge von λ =390nm angeregt und die Emission bei λ =460nm gemessen.

5.4.2 *Proteasome-Glo Cell Based Assay*

Der *Proteasome-GloTM*-Assay (Promega) wurde nach Herstellerangaben durchgeführt, um die Aktivität des Proteasoms nach Transfektion der Zellen mit den Expressionsplasmiden V1–V5 *in vivo* zu messen. Als Kontrollen dienten 1. Zellen, die nur mit dem Leervektor transfiziert waren, 2. nur Medium ohne Zellen, 3. Zellen mit Leervektortransfektion und 10 μ M MG132 direkt im *Glo*-Assay Substratreagenz. Für jeden Ansatz wurde eine Achtfachbestimmung durchgeführt. Die Messung der Lumineszenz erfolgte an einem Mikroplattenleser.

5.4.3 *MTT-Assay*

Um zu überprüfen, ob die Überexpression von PI31 und der Varianten einen Einfluß auf die Lebensfähigkeit der Zellen hat, wurde ein MTT-Assay durchgeführt. Dabei wird der gelbe Farbstoff MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) von lebenden Zellen aufgenommen und mit Hilfe mitochondrialer Dehydrogenasen zu einem blauen, wasserunlöslichen Formazanfarbstoff umgesetzt. Für die photometrische Messung (Absorption bei $\lambda=570\text{--}590\text{nm}$) werden die Zellen lysiert, um den Farbstoff freizusetzen. Die Intensität der Blaufärbung korreliert mit der metabolischen Aktivität der Zellen.

Die Zellen wurden in einer 96 *well*-Platte ausgesät und über Nacht transfiziert. Es folgte die Zugabe von 50 μ l des MTT-Farbstoffes direkt ins Medium (100 μ l) zu den Zellen und eine Inkubation für 3h bei 37°C. Zu der Positivkontrolle wurde vor Farbstoffzugabe 1 μ l NP40 gegeben. Nach der Inkubation erfolgte die Zellyse mit 100 μ l 10% SDS für 1h bei Raumtemperatur. Die Messung der 5fach-Ansätze erfolgte bei $\lambda=570\text{nm}$.

5.4.4 *CAT-ELISA*

Nach Transfektion von HeLa-Zellen mit den CAT-Reportergenkonstrukten wurde die PI31-Promotoraktivität in Zellysaten mit einem CAT-ELISA (Roche) gemessen. Dabei wird quantitativ die Menge der exprimierten Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT) mit Hilfe eines *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA) bestimmt. Es wurde nach Herstellerangaben vorgegangen und Doppelansätze gemessen. Die Messung erfolgte im Mikroplattenleser bei $\lambda=405\text{nm}$. Die Messwerte wurden daraufhin auf die Proteinkonzentration der jeweilige Lysate normiert und die Werte von nur mit Lipofectamin transfizierten Zellen als Hintergrund abgezogen.

5.5 Computergestützte Methoden

Für die Entwicklung von Klonierungsstrategien und zum Primerdesign wurden die in Tabelle 5.13 aufgeführten cDNA- und Genomdatenbanken sowie molekularbiologischen *Online*-Programme genutzt.

URL	Datenbank/Programm
http://www.ensembl.org	Genom-Datenbank Ensembl
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/IEB/Research/AceView/index.html	Genom-Datenbank AceView
http://www.genecards.org/index.shtml	Genom-Datenbank GeneCards
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/	PubMed, Datenbanken, BLAST etc.
http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html	<i>Oligonucleotide Properties Calculator</i>
http://www.basic.northwestern.edu/biotools/proteincalc.html	<i>Peptide Property Calculator</i>
http://arbl.cvmbs.colostate.edu/molkit/index.html	<i>Molecular Toolkit</i>
http://www.expasy.org/	<i>ExPASy Proteomics Server</i>
http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html	<i>ClustalW</i> Alignmentprogramm
http://rna.lundberg.gu.se/cutter2/	Webcutter 2.0
http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php	NEBcutter V2.0
http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/	Vorhersage von Spleißstellen

Tabelle 5.13: Datenbanken und *Online*-Programme

Die oben angegebenen Datenbanken und Programme stellen nur eine Auswahl aller genutzten Internet-Möglichkeiten dar.

Abkürzungsverzeichnis

AAA-ATPasen	ATPasen assoziiert mit verschiedenen zellulären Aktivitäten
AK	Antikörper
AP-1	Aktivatorprotein
ARE	AU-reiches Element
AS	Aminosäure
ATF	<i>activating transcription factor</i>
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
C/EBP	<i>CCAAT enhancer binding protein</i>
CAT	Chloramphenicol-Acetyltransferase
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CD2BP2	CD2 bindendes Protein 2
cDNA	komplementäre DNA
CHX	Cycloheximid
CpG	Cytosin/Phosphat/Guanin-Dinucleotid
CTL	cytotoxischer T-Lymphozyt
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
DSP	Dithiobis(succinimidylpropionat)
dsRNA	Doppelstrang RNA
DTT	Dithiothreitol
EBV	Epstein Barr Virus
EGFP	<i>enhanced green fluorescence protein</i>
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
ER	Endoplasmatisches Reticulum
ERAD	ER-assoziierte Degradation
Ex.	Exon
Fbxo7	F-Box Protein 7
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat Dehydrogenase
GAS	<i>IFNγ-activated sites</i>
GIGYF	Grb10 interagierendes GYF-Protein
GYF	Glycin, Tyrosin, Phenylalanin
HERPUD-1	<i>Homocysteine-responsive ER-resident ubiquitin-like domain member 1</i>
hnRNP-G-T	<i>heterogeneous ribonucleoprotein G-testis</i>
HSP	Hitzeschockprotein
HURP	<i>hepatoma upregulated protein</i>
IFN	Interferon
I- κ B α	Inhibitor- κ B α
IP	Immunpräzipitation
IQGAP1	<i>Ras GTPase-activating-like protein</i>
IRF	<i>interferon regulatory factor</i>
ISG	IFN-stimulierte Gene
ISRE	<i>IFN-stimulated response element</i>
JAK	<i>Janus activated kinase</i>

kb	kilo Basen
kDa	kilo Dalton
LMP2/7	<i>low molecular weight protein</i>
Mda-5	<i>melanoma differentiation-associated gene 5</i>
MECL1	<i>multicatalytic endopeptidase complex subunit 1</i>
MG132	ein synthetischer reversibler Proteasominhibitor (Z-Leu-Leu-Leu-Aldehyd)
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
miRNA	micro RNA
mRNA	<i>messenger RNA</i>
mRNP	<i>messenger Ribonucleoprotein-Partikel</i>
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NF- κ B	<i>nuclear factor-κB</i>
NMD	<i>nonsense mediated mRNA decay</i>
Nrf2	<i>NF-E2-related factor 2</i>
OAS	<i>2',5'-oligoadenylate synthetase</i>
ORF	<i>open reading frame</i>
PA28/200/700	Proteasomaktivator
PAC	<i>proteasome assembly chaperone</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PERQ	Prolin, Glutamat, Arginin, Glutamin reiches Protein mit GYF-Domäne
pers. Komm.	persönliche Kommunikation
PI31	Proteasominhibitor 31
PKR	<i>double-stranded RNA-activated protein kinase</i>
POMP	<i>proteasome maturation protein</i>
RBMV	<i>RNA-binding motif encoded by the Y chromosome</i>
RIG-I	<i>retinoic acid inducible gene I</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
SCF	Skp1, Cullin1, F-Box
SDS-PAGE	Sodium Dodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SH3	<i>src homology domain</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
Suppl. Data	<i>Supplementary Data</i>
SylA	Syringolin A
TAF	TBP-assoziiierter Faktor
TAP	Transporter, assoziiert mit der Antigenprozessierung
TBP	TATA bindendes Protein
TF	Transkriptionsfaktor
TLR	<i>Toll like receptor</i>
TSS	Transkriptionsstart
T-STAR	<i>testis-signal transduction and RNA processing</i>
U	<i>unit</i>
Ub	Ubiquitin
Ubl	<i>ubiquitin-like</i>
UE	Untereinheit
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
UTR	untranslatierte Region
V1–10	Variante 1–10
VSIG	<i>virus stress inducible gene</i>
WB	Westernblot
WW-Domäne	Domäne mit zwei konservierten Tryptophanresten (W)

Literaturverzeichnis

- Aki, M., Shimbara, N., Takashina, M., Akiyama, K., Kagawa, S., Tamura, T., Tanahashi, N., Yoshimura, T., Tanaka, K. und Ichihara, A.: Interferon-gamma induces different subunit organizations and functional diversity of proteasomes. In: *J Biochem*, Band 115:S. 257–269, 1994.
- Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R. und Flavell, R. A.: Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. In: *Nature*, Band 413:S. 732–738, 2001.
- Almeida, C. G., Takahashi, R. H. und Gouras, G. K.: Beta-amyloid accumulation impairs multivesicular body sorting by inhibiting the ubiquitin-proteasome system. In: *J Neurosci*, Band 26:S. 4277–4288, 2006.
- Boes, B., Hengel, H., Ruppert, T., Multhaup, G., Koszinowski, U. H. und Kloetzel, P. M.: Interferon gamma stimulation modulates the proteolytic activity and cleavage site preference of 20S mouse proteasomes. In: *J Exp Med*, Band 179:S. 901–909, 1994.
- Bousquet-Dubouch, M.-P., Baudelet, E., Guérin, F., Matondo, M., Uttenweiler-Joseph, S., Burlet-Schiltz, O. und Monsarrat, B.: A novel affinity-based purification procedure of human proteasome complexes and proteasome interacting proteins. In: *Posterbeitrag beim Third Intracellular Proteolysis Meeting, Teneriffa*. 2008.
- Braun, B. C., Glickman, M., Kraft, R., Dahlmann, B., Kloetzel, P. M., Finley, D. und Schmidt, M.: The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity. In: *Nat Cell Biol*, Band 1:S. 221–226, 1999.
- Brinkman, B. M. N.: Splice variants as cancer biomarkers. In: *Clin Biochem*, Band 37:S. 584–594, 2004.
- Brooks, C. L. und Gu, W.: p53 ubiquitination: Mdm2 and beyond. In: *Mol Cell*, Band 21:S. 307–315, 2006.

- Brooks, P., Fuertes, G., Murray, R. Z., Bose, S., Knecht, E., Rechsteiner, M. C., Hendil, K. B., Tanaka, K., Dyson, J. und Rivett, J.: Subcellular localization of proteasomes and their regulatory complexes in mammalian cells. In: *Biochem J*, Band 346 Pt 1:S. 155–161, 2000.
- Calfon, M., Zeng, H., Urano, F., Till, J. H., Hubbard, S. R., Harding, H. P., Clark, S. G. und Ron, D.: IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. In: *Nature*, Band 415:S. 92–96, 2002.
- Chang, Y.-F., Cheng, C.-M., Chang, L.-K., Jong, Y.-J. und Yuo, C.-Y.: The F-box protein Fbxo7 interacts with human inhibitor of apoptosis protein cIAP1 and promotes cIAP1 ubiquitination. In: *Biochem Biophys Res Commun*, Band 342:S. 1022–1026, 2006.
- Coscoy, L., Sanchez, D. J. und Ganem, D.: A novel class of herpesvirus-encoded membrane-bound E3 ubiquitin ligases regulates endocytosis of proteins involved in immune recognition. In: *J Cell Biol*, Band 155:S. 1265–1273, 2001.
- Cullinan, S. B., Zhang, D., Hannink, M., Arvisais, E., Kaufman, R. J. und Diehl, J. A.: Nrf2 is a direct PERK substrate and effector of PERK-dependent cell survival. In: *Mol Cell Biol*, Band 23:S. 7198–7209, 2003.
- DeJong, J.: Basic mechanisms for the control of germ cell gene expression. In: *Gene*, Band 366:S. 39–50, 2006.
- Dick, T. P., Nussbaum, A. K., Deeg, M., Heinemeyer, W., Groll, M., Schirle, M., Keilholz, W., Stevanović, S., Wolf, D. H., Huber, R., Rammensee, H. G. und Schild, H.: Contribution of proteasomal beta-subunits to the cleavage of peptide substrates analyzed with yeast mutants. In: *J Biol Chem*, Band 273:S. 25637–25646, 1998.
- Dick, T. P., Ruppert, T., Groettrup, M., Kloetzel, P. M., Kuehn, L., Koszinowski, U. H., Stevanović, S., Schild, H. und Rammensee, H. G.: Coordinated dual cleavages induced by the proteasome regulator PA28 lead to dominant MHC ligands. In: *Cell*, Band 86:S. 253–262, 1996.
- Ding, Q. und Keller, J. N.: Proteasomes and proteasome inhibition in the central nervous system. In: *Free Radic Biol Med*, Band 31:S. 574–584, 2001.
- Elliott, D. J. und Grellscheid, S. N.: Alternative RNA splicing regulation in the testis. In: *Reproduction*, Band 132:S. 811–819, 2006.
- Esteller, M.: Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. In: *Hum Mol Genet*, Band 16 Spec No 1:S. R50–R59, 2007.

- Frentzel, S., Pesold-Hurt, B., Seelig, A. und Kloetzel, P. M.: 20 S proteasomes are assembled via distinct precursor complexes. Processing of LMP2 and LMP7 proproteins takes place in 13-16 S preproteasome complexes. In: *J Mol Biol*, Band 236:S. 975–981, 1994.
- Fricke, B., Heink, S., Steffen, J., Kloetzel, P.-M und Krüger, E.: The proteasome maturation protein POMP facilitates major steps of 20S proteasome formation at the endoplasmic reticulum. In: *EMBO Rep*, Band 8:S. 1170–1175, 2007.
- Gao, G. und Luo, H.: The ubiquitin-proteasome pathway in viral infections. In: *Can J Physiol Pharmacol*, Band 84:S. 5–14, 2006.
- Gao, Y., Lecker, S., Post, M. J., Hietaranta, A. J., Li, J., Volk, R., Li, M., Sato, K., Saluja, A. K., Steer, M. L., Goldberg, A. L. und Simons, M.: Inhibition of ubiquitin-proteasome pathway-mediated I kappa B alpha degradation by a naturally occurring antibacterial peptide. In: *J Clin Invest*, Band 106:S. 439–448, 2000.
- Giovannone, B., Lee, E., Laviola, L., Giorgino, F., Cleveland, K. A. und Smith, R. J.: Two novel proteins that are linked to insulin-like growth factor (IGF-I) receptors by the Grb10 adapter and modulate IGF-I signaling. In: *J Biol Chem*, Band 278:S. 31564–31573, 2003.
- Glickman, M. H. und Ciechanover, A.: The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: Destruction for the sake of construction. In: *Physiol Rev*, Band 82:S. 373–428, 2002.
- Goldberg, A. L.: Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. In: *Nature*, Band 426:S. 895–899, 2003.
- Gotoh, B., Komatsu, T., Takeuchi, K. und Yokoo, J.: Paramyxovirus strategies for evading the interferon response. In: *Rev Med Virol*, Band 12:S. 337–357, 2002.
- Gotthardt, D., Blancheteau, V., Bosserhoff, A., Ruppert, T., Delorenzi, M. und Soldati, T.: Proteomics fingerprinting of phagosome maturation and evidence for the role of a Galpha during uptake. In: *Mol Cell Proteomics*, Band 5:S. 2228–2243, 2006.
- Gregori, L., Fuchs, C., Figueiredo-Pereira, M. E., Van Nostrand, W. E. und Goldgaber, D.: Amyloid beta-protein inhibits ubiquitin-dependent protein degradation in vitro. In: *J Biol Chem*, Band 270:S. 19702–19708, 1995.
- Groettrup, M., Kraft, R., Kostka, S., Standera, S., Stohwasser, R. und Kloetzel, P. M.: A third interferon-gamma-induced subunit exchange in the 20S proteasome. In: *Eur J Immunol*, Band 26:S. 863–869, 1996a.

- Groettrup, M., Soza, A., Eggers, M., Kuehn, L., Dick, T. P., Schild, H., Rammensee, H. G., Koszinowski, U. H. und Kloetzel, P. M.: A role for the proteasome regulator PA28alpha in antigen presentation. In: *Nature*, Band 381:S. 166–168, 1996b.
- Groll, M., Bajorek, M., Köhler, A., Moroder, L., Rubin, D. M., Huber, R., Glickman, M. H. und Finley, D.: A gated channel into the proteasome core particle. In: *Nat Struct Biol*, Band 7:S. 1062–1067, 2000.
- Groll, M., Ditzel, L., Löwe, J., Stock, D., Bochtler, M., Bartunik, H. D. und Huber, R.: Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. In: *Nature*, Band 386:S. 463–471, 1997.
- Groll, M., Schellenberg, B., Bachmann, A. S., Archer, C. R., Huber, R., Powell, T. K., Lindow, S., Kaiser, M. und Dudler, R.: A plant pathogen virulence factor inhibits the eukaryotic proteasome by a novel mechanism. In: *Nature*, Band 452:S. 755–758, 2008.
- Harada, H., Fujita, T., Miyamoto, M., Kimura, Y., Maruyama, M., Furia, A., Miyata, T. und Taniguchi, T.: Structurally similar but functionally distinct factors, IRF-1 and IRF-2, bind to the same regulatory elements of IFN and IFN-inducible genes. In: *Cell*, Band 58:S. 729–739, 1989.
- He, L. und Hannon, G. J.: MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. In: *Nat Rev Genet*, Band 5:S. 522–531, 2004.
- Heink, S., Ludwig, D., Kloetzel, P.-M. und Krüger, E.: IFN-gamma-induced immune adaptation of the proteasome system is an accelerated and transient response. In: *Proc Natl Acad Sci U S A*, Band 102:S. 9241–9246, 2005.
- Heinze, M., Kofler, M. und Freund, C.: Investigating the functional role of CD2BP2 in T cells. In: *Int Immunol*, Band 19:S. 1313–1318, 2007.
- Hendil, K. B., Kristensen, P. und Uerkevitz, W.: Human proteasomes analysed with monoclonal antibodies. In: *Biochem J*, Band 305 (Pt 1):S. 245–252, 1995.
- Hershko, A. und Ciechanover, A.: The ubiquitin system. In: *Annu Rev Biochem*, Band 67:S. 425–479, 1998.
- Hicke, L., Schubert, H. L. und Hill, C. P.: Ubiquitin-binding domains. In: *Nat Rev Mol Cell Biol*, Band 6:S. 610–621, 2005.
- Hillman, R. T., Green, R. E. und Brenner, S. E.: An unappreciated role for RNA surveillance. In: *Genome Biol*, Band 5:S. R8–R8, 2004.

- Hirano, Y., Hayashi, H., Iemura, S.-I., Hendil, K. B., Niwa, S.-I., Kishimoto, T., Kasahara, M., Natsume, T., Tanaka, K. und Murata, S.: Cooperation of multiple chaperones required for the assembly of mammalian 20S proteasomes. In: *Mol Cell*, Band 24:S. 977–984, 2006.
- Hirano, Y., Hendil, K. B., Yashiroda, H., Iemura, S.-I., Nagane, R., Hioki, Y., Natsume, T., Tanaka, K. und Murata, S.: A heterodimeric complex that promotes the assembly of mammalian 20S proteasomes. In: *Nature*, Band 437:S. 1381–1385, 2005.
- Ho, M. S., Tsai, P.-I und Chien, C.-T.: F-box proteins: the key to protein degradation. In: *J Biomed Sci*, Band 13:S. 181–191, 2006.
- Hoffman, L., Pratt, G. und Rechsteiner, M.: Multiple forms of the 20 S multicatalytic and the 26 S ubiquitin/ATP-dependent proteases from rabbit reticulocyte lysate. In: *J Biol Chem*, Band 267:S. 22362–22368, 1992.
- Holmberg, C. I., Staniszewski, K. E., Mensah, K. N., Matouschek, A. und Morimoto, R. I.: Inefficient degradation of truncated polyglutamine proteins by the proteasome. In: *EMBO J*, Band 23:S. 4307–4318, 2004.
- House, Amy E. und Lynch, Kristen W.: Regulation of alternative splicing: more than just the ABCs. In: *J Biol Chem*, Band 283:S. 1217–1221, 2008.
- Hsu, J.-M., Lee, Y.-C. G., Yu, C.-T. R. und Huang, C.-Y. F.: Fbx7 functions in the SCF complex regulating Cdk1-cyclin B-phosphorylated hepatoma up-regulated protein (HURP) proteolysis by a proline-rich region. In: *J Biol Chem*, Band 279:S. 32592–32602, 2004.
- Huang, M. T. und Gorman, C. M.: The simian virus 40 small-t intron, present in many common expression vectors, leads to aberrant splicing. In: *Mol Cell Biol*, Band 10:S. 1805–1810, 1990.
- Husnjak, K., Elsasser, S., Zhang, N., Chen, X., Randles, L., Shi, Y., Hofmann, K., Walters, K. J., Finley, D. und Dikic, I.: Proteasome subunit Rpn13 is a novel ubiquitin receptor. In: *Nature*, Band 453:S. 481–488, 2008.
- Jacobs, B. L. und Langland, J. O.: When two strands are better than one: the mediators and modulators of the cellular responses to double-stranded RNA. In: *Virology*, Band 219:S. 339–349, 1996.
- Jensen, L. E. und Whitehead, A. S.: The 3' untranslated region of the membrane-bound IL-1R accessory protein mRNA confers tissue-specific destabilization. In: *J Immunol*, Band 173:S. 6248–6258, 2004.

- Johnson, J. M., Castle, J., Garrett-Engele, P., Kan, Z., Loerch, P. M., Armour, C. D., Santos, R., Schadt, E. E., Stoughton, R. und Shoemaker, D. D.: Genome-wide survey of human alternative pre-mRNA splicing with exon junction microarrays. In: *Science*, Band 302:S. 2141–2144, 2003.
- Jønson, L., Vikesaa, J., Krogh, A., Nielsen, L. K., Hansen, T., Borup, R., Johnsen, A. H., Christiansen, J. und Nielsen, F. C.: Molecular composition of IMP1 ribonucleoprotein granules. In: *Mol Cell Proteomics*, Band 6:S. 798–811, 2007.
- Kang, D., Gopalkrishnan, R. V., Wu, Q., Jankowsky, E., Pyle, A. M. und Fisher, P. B.: Mda-5: An interferon-inducible putative RNA helicase with double-stranded RNA-dependent ATPase activity and melanoma growth-suppressive properties. In: *Proc Natl Acad Sci U S A*, Band 99:S. 637–642, 2002.
- Kay, B. K., Williamson, M. P. und Sudol, M.: The importance of being proline: the interaction of proline-rich motifs in signaling proteins with their cognate domains. In: *FASEB J*, Band 14:S. 231–241, 2000.
- Keene, J. D. und Tenenbaum, S. A.: Eukaryotic mRNPs may represent posttranscriptional operons. In: *Mol Cell*, Band 9:S. 1161–1167, 2002.
- Kirk, R., Laman, H., Knowles, P. P., Murray-Rust, J., Lomonosov, M., Meziane, E. K. und McDonald, N. Q.: Structure of a conserved dimerisation domain within the F-box protein Fbxo7 and the PI31 proteasome inhibitor. In: *J Biol Chem*, 2008.
- Klare, N., Seeger, M., Janek, K., Jungblut, P. R. und Dahlmann, B.: Intermediate-type 20 S proteasomes in HeLa cells: “asymmetric” subunit composition, diversity and adaptation. In: *J Mol Biol*, Band 373:S. 1–10, 2007.
- Kloetzel, P. M.: Antigen processing by the proteasome. In: *Nat Rev Mol Cell Biol*, Band 2:S. 179–187, 2001.
- Kloetzel, P. M.: Generation of major histocompatibility complex class I antigens: Functional interplay between proteasomes and TPPII. In: *Nat Immunol*, Band 5:S. 661–669, 2004.
- Kobayashi, A., Kang, M.-I., Okawa, H., Ohtsuji, M., Zenke, Y., Chiba, T., Igarashi, K. und Yamamoto, M.: Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. In: *Mol Cell Biol*, Band 24:S. 7130–7139, 2004.

- Kofler, M., Heuer, K., Zech, T. und Freund, C.: Recognition sequences for the GYF domain reveal a possible spliceosomal function of CD2BP2. In: *J Biol Chem*, Band 279:S. 28292–28297, 2004.
- Kofler, M., Motzny, K., Beyermann, M. und Freund, C.: Novel interaction partners of the CD2BP2-GYF domain. In: *J Biol Chem*, Band 280:S. 33397–33402, 2005a.
- Kofler, M., Motzny, K. und Freund, C.: GYF domain proteomics reveals interaction sites in known and novel target proteins. In: *Mol Cell Proteomics*, Band 4:S. 1797–1811, 2005b.
- Kofler, M. M. und Freund, C.: The GYF domain. In: *FEBS J*, Band 273:S. 245–256, 2006.
- Kokame, K., Agarwala, K. L., Kato, H. und Miyata, T.: Herp, a new ubiquitin-like membrane protein induced by endoplasmic reticulum stress. In: *J Biol Chem*, Band 275:S. 32846–32853, 2000.
- Kopelman, N. M., Lancet, D. und Yanai, I.: Alternative splicing and gene duplication are inversely correlated evolutionary mechanisms. In: *Nat Genet*, Band 37:S. 588–589, 2005.
- Kornitzer, D. und Ciechanover, A.: Modes of regulation of ubiquitin-mediated protein degradation. In: *J Cell Physiol*, Band 182:S. 1–11, 2000.
- Kuckelkorn, U., Frentzel, S., Kraft, R., Kostka, S., Groettrup, M. und Kloetzel, P. M.: Incorporation of major histocompatibility complex-encoded subunits LMP2 and LMP7 changes the quality of the 20S proteasome polypeptide processing products independent of interferon-gamma. In: *Eur J Immunol*, Band 25:S. 2605–2611, 1995.
- Kuznetsova, E. B., Kekeeva, T. V., Larin, S. S., Zemliakova, V. V., Babenko, O. V., Nemtsova, M. V., Zaletaev, D. V. und Strel'nikov, V. V.: Novel methylation and expression markers associated with breast cancer. In: *Mol Biol (Mosk)*, Band 41:S. 624–633, 2007.
- Kwak, M. K., Itoh, K., Yamamoto, M., Sutter, T. R. und Kensler, T. W.: Role of transcription factor Nrf2 in the induction of hepatic phase 2 and antioxidative enzymes in vivo by the cancer chemoprotective agent, 3H-1, 2-dimethiole-3-thione. In: *Mol Med*, Band 7:S. 135–145, 2001.
- Laggerbauer, B., Liu, S., Makarov, E., Vornlocher, H. P., Makarova, O., Ingelfinger, D., Achsel, T. und Lührmann, R.: The human U5 snRNP 52K protein (CD2BP2) interacts with U5-102K (hPrp6), a U4/U6.U5 tri-snRNP bridging protein, but dissociates upon tri-snRNP formation. In: *RNA*, Band 11:S. 598–608, 2005.

- Landgraf, P., Rusu, M., Sheridan, R., Sewer, A., Iovino, N., Aravin, A., Pfeffer, S., Rice, A., Kamphorst, A. O. und Landthaler, M. et al.: A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. In: *Cell*, Band 129:S. 1401–1414, 2007.
- Le Tallec, B., Barrault, M.-B., Courbeyrette, R., Guérois, R., Marsolier-Kergoat, M.-C. und Peyroche, A.: 20S proteasome assembly is orchestrated by two distinct pairs of chaperones in yeast and in mammals. In: *Mol Cell*, Band 27:S. 660–674, 2007.
- Lee, M. S. und Kim, Y.-J.: Signaling pathways downstream of pattern-recognition receptors and their cross talk. In: *Annu Rev Biochem*, Band 76:S. 447–480, 2007.
- Lee, W. L., Kim, M. K., Schreiber, A. D. und Grinstein, S.: Role of ubiquitin and proteasomes in phagosome maturation. In: *Mol Biol Cell*, Band 16:S. 2077–2090, 2005.
- Levitskaya, J., Sharipo, A., Leonchiks, A., Ciechanover, A. und Masucci, M. G.: Inhibition of ubiquitin/proteasome-dependent protein degradation by the Gly-Ala repeat domain of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 1. In: *Proc Natl Acad Sci U S A*, Band 94:S. 12616–12621, 1997.
- Lewis, B. P., Green, R. E. und Brenner, S. E.: Evidence for the widespread coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay in humans. In: *Proc Natl Acad Sci U S A*, Band 100:S. 189–192, 2003.
- Li, J., Gao, X., Ortega, J., Nazif, T., Joss, L., Bogyo, M., Steven, A. C. und Rechsteiner, M.: Lysine 188 substitutions convert the pattern of proteasome activation by REGgamma to that of REGs alpha and beta. In: *EMBO J*, Band 20:S. 3359–3369, 2001.
- Li, J., Post, M., Volk, R., Gao, Y., Li, M., Metais, C., Sato, K., Tsai, J., Aird, W., Rosenberg, R. D., Hampton, T. G., Sellke, F., Carmeliet, P. und Simons, M.: PR39, a peptide regulator of angiogenesis. In: *Nat Med*, Band 6:S. 49–55, 2000.
- Lindersson, E., Beedholm, R., Højrup, P., Moos, T., Gai, W., Hendil, K. B. und Jensen, P. H.: Proteasomal inhibition by alpha-synuclein filaments and oligomers. In: *J Biol Chem*, Band 279:S. 12924–12934, 2004.
- Lu, J., Getz, G., Miska, E. A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebert, B. L., Mak, R. H., Ferrando, A. A., Downing, J. R., Jacks, T., Horvitz, H. R. und Golub, T. R.: MicroRNA expression profiles classify human cancers. In: *Nature*, Band 435:S. 834–838, 2005.

- Ma, C.-P., Slaughter, C. A. und DeMartino, G. N.: Purification and characterization of a protein inhibitor of the 20S proteasome (macropain). In: *Biochim Biophys Acta*, Band 1119:S. 303–311, 1992.
- McCutchen-Maloney, S. L., Matsuda, K., Shimbara, N., Binns, D. D., Tanaka, K., Slaughter, C. A. und DeMartino, G. N.: cDNA cloning, expression, and functional characterization of PI31, a proline-rich inhibitor of the proteasome. In: *J Biol Chem*, Band 275:S. 18557–18565, 2000.
- McPherson, P. S.: Regulatory role of SH3 domain-mediated protein-protein interactions in synaptic vesicle endocytosis. In: *Cell Signal*, Band 11:S. 229–238, 1999.
- Mendez, R. und Richter, J. D.: Translational control by CPEB: a means to the end. In: *Nat Rev Mol Cell Biol*, Band 2:S. 521–529, 2001.
- Mignone, F., Gissi, C., Liuni, S. und Pesole, G.: Untranslated regions of mRNAs. In: *Genome Biol*, Band 3:S. REVIEWS0004–REVIEWS0004, 2002.
- Nagy, E. und Maquat, L. E.: A rule for termination-codon position within intron-containing genes: when nonsense affects RNA abundance. In: *Trends Biochem Sci*, Band 23:S. 198–199, 1998.
- Nandi, D., Woodward, E., Ginsburg, D. B. und Monaco, J. J.: Intermediates in the formation of mouse 20S proteasomes: Implications for the assembly of precursor beta subunits. In: *EMBO J*, Band 16:S. 5363–5375, 1997.
- Nishizawa, K., Freund, C., Li, J., Wagner, G. und Reinherz, E. L.: Identification of a proline-binding motif regulating CD2-triggered T lymphocyte activation. In: *Proc Natl Acad Sci U S A*, Band 95:S. 14897–14902, 1998.
- Orlowski, M. und Wilk, S.: Catalytic activities of the 20 S proteasome, a multicatalytic proteinase complex. In: *Arch Biochem Biophys*, Band 383:S. 1–16, 2000.
- Palmer, A., Rivett, A. J., Thomson, S., Hendil, K. B., Butcher, G. W., Fuertes, G. und Knecht, E.: Subpopulations of proteasomes in rat liver nuclei, microsomes and cytosol. In: *Biochem J*, Band 316 (Pt 2):S. 401–407, 1996.
- Patrick, G. N., Bingol, B., Weld, H. A. und Schuman, E. M.: Ubiquitin-mediated proteasome activity is required for agonist-induced endocytosis of GluRs. In: *Curr Biol*, Band 13:S. 2073–2081, 2003.

- Platanias, L. C.: Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. In: *Nat Rev Immunol*, Band 5:S. 375–386, 2005.
- Purdom-Dickinson, S. E., Sheveleva, E. V., Sun, H. und Chen, Q. M.: Translational control of nrf2 protein in activation of antioxidant response by oxidants. In: *Mol Pharmacol*, Band 72:S. 1074–1081, 2007.
- Realini, C., Dubiel, W., Pratt, G., Ferrell, K. und Rechsteiner, M.: Molecular cloning and expression of a gamma-interferon-inducible activator of the multicatalytic protease. In: *J Biol Chem*, Band 269:S. 20727–20732, 1994.
- Rechsteiner, M. und Hill, C. P.: Mobilizing the proteolytic machine: cell biological roles of proteasome activators and inhibitors. In: *Trends Cell Biol*, Band 15:S. 27–33, 2005.
- Reis, L. F., Harada, H., Wolchok, J. D., Taniguchi, T. und Vilcek, J.: Critical role of a common transcription factor, IRF-1, in the regulation of IFN-beta and IFN-inducible genes. In: *EMBO J*, Band 11:S. 185–193, 1992.
- Rittmeyer, E. N., Daniel, S., Hsu, S. und Osman, M. A.: A dual role for IQGAP1 in regulating exocytosis. In: *J Cell Sci*, Band 121:S. 391–403, 2008.
- Rivett, A. J., Palmer, A. und Knecht, E.: Electron microscopic localization of the multicatalytic proteinase complex in rat liver and in cultured cells. In: *J Histochem Cytochem*, Band 40:S. 1165–1172, 1992.
- Sai, X., Kokame, K., Shiraishi, H., Kawamura, Y., Miyata, T., Yanagisawa, K. und Komano, H.: The ubiquitin-like domain of Herp is involved in Herp degradation, but not necessary for its enhancement of amyloid beta-protein generation. In: *FEBS Lett*, Band 553:S. 151–156, 2003.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T.: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989.
- Schmidtke, G., Kraft, R., Kostka, S., Henklein, P., Frömmel, C., Löwe, J., Huber, R., Kloetzel, P. M. und Schmidt, M.: Analysis of mammalian 20S proteasome biogenesis: the maturation of beta-subunits is an ordered two-step mechanism involving autocatalysis. In: *EMBO J*, Band 15:S. 6887–6898, 1996.
- Schreiner, P., Chen, X., Husnjak, K., Randles, L., Zhang, N., Elsasser, S., Finley, D., Dikic, I., Walters, K. J. und Groll, M.: Ubiquitin docking at the proteasome through a novel pleckstrin-homology domain interaction. In: *Nature*, Band 453:S. 548–552, 2008.

- Schulze, A., Standera, S., Buerger, E., Kikkert, M., van Voorden, S., Wiertz, E., Koning, F., Kloetzel, P.-M. und Seeger, M.: The ubiquitin-domain protein HERP forms a complex with components of the endoplasmic reticulum associated degradation pathway. In: *J Mol Biol*, Band 354:S. 1021–1027, 2005.
- Sen, G. C. und Peters, G. A.: Viral stress-inducible genes. In: *Adv Virus Res*, Band 70:S. 233–263, 2007.
- Shin, E.-C., Seifert, U., Kato, T., Rice, C. M., Feinstone, S. M., Kloetzel, P.-M. und Reherrmann, B.: Virus-induced type I IFN stimulates generation of immunoproteasomes at the site of infection. In: *J Clin Invest*, Band 116:S. 3006–3014, 2006.
- Shin, E.-C., Seifert, U., Urban, S., Truong, K.-T., Feinstone, S. M., Rice, C. M., Kloetzel, P.-M. und Reherrmann, B.: Proteasome activator and antigen-processing aminopeptidases are regulated by virus-induced type I interferon in the hepatitis C virus-infected liver. In: *J Interferon Cytokine Res*, Band 27:S. 985–990, 2007.
- Smith, D. M., Chang, S.-C., Park, S., Finley, D., Cheng, Y. und Goldberg, A. L.: Docking of the proteasomal ATPases' carboxyl termini in the 20S proteasome's alpha ring opens the gate for substrate entry. In: *Mol Cell*, Band 27:S. 731–744, 2007.
- Stamm, S., Ben-Ari, S., Rafalska, I., Tang, Y., Zhang, Z., Toiber, D., Thanaraj, T. A. und Soreq, H.: Function of alternative splicing. In: *Gene*, Band 344:S. 1–20, 2005.
- Stohwasser, R., Salzmann, U., Giesebrecht, J., Kloetzel, P. M. und Holzhütter, H. G.: Kinetic evidences for facilitation of peptide channelling by the proteasome activator PA28. In: *Eur J Biochem*, Band 267:S. 6221–6230, 2000.
- Stuart, L. M., Boulais, J., Charriere, G. M., Hennessy, E. J., Brunet, S., Jutras, I., Goyette, G., Rondeau, C., Letarte, S., Huang, H., Ye, P., Morales, F., Kocks, C., Bader, J. S., Desjardins, M. und Ezekowitz, R. A. B.: A systems biology analysis of the Drosophila phagosome. In: *Nature*, Band 445:S. 95–9101, 2007.
- Tanahashi, N., Murakami, Y., Minami, Y., Shimbara, N., Hendil, K. B. und Tanaka, K.: Hybrid proteasomes. Induction by interferon-gamma and contribution to ATP-dependent proteolysis. In: *J Biol Chem*, Band 275:S. 14336–14345, 2000.
- Tang, X., Orlicky, S., Lin, Z., Willems, A., Neculai, D., Ceccarelli, D., Mercurio, F., Shilton, B. H., Sicheri, F. und Tyers, M.: Suprafacial orientation of the SCFCdc4 dimer accommodates multiple geometries for substrate ubiquitination. In: *Cell*, Band 129:S. 1165–1176, 2007.

- Taniguchi, T. und Takaoka, A.: The interferon-alpha/beta system in antiviral responses: a multimodal machinery of gene regulation by the IRF family of transcription factors. In: *Curr Opin Immunol*, Band 14:S. 111–116, 2002.
- van Endert, P. M., Riganelli, D., Greco, G., Fleischhauer, K., Sidney, J., Sette, A. und Bach, J. F.: The peptide-binding motif for the human transporter associated with antigen processing. In: *J Exp Med*, Band 182:S. 1883–1895, 1995.
- van Laar, T., Schouten, T., Hoogervorst, E., van Eck, M., van der Eb, A. J. und Terleth, C.: The novel MMS-inducible gene Mif1/KIAA0025 is a target of the unfolded protein response pathway. In: *FEBS Lett*, Band 469:S. 123–131, 2000.
- Weis, L. und Reinberg, D.: Transcription by RNA polymerase II: initiator-directed formation of transcription-competent complexes. In: *FASEB J*, Band 6:S. 3300–3309, 1992.
- Williamson, M. P.: The structure and function of proline-rich regions in proteins. In: *Biochem J*, Band 297 (Pt 2):S. 249–260, 1994.
- Wise, R. J., Orkin, S. H. und Collins, T.: Aberrant expression of platelet-derived growth factor A-chain cDNAs due to cryptic splicing of RNA transcripts in COS-1 cells. In: *Nucleic Acids Res*, Band 17:S. 6591–6601, 1989.
- Witt, E., Zantopf, D., Schmidt, M., Kraft, R., Kloetzel, P. M. und Krüger, E.: Characterisation of the newly identified human Ump1 homologue POMP and analysis of LMP7(beta 5i) incorporation into 20 S proteasomes. In: *J Mol Biol*, Band 301:S. 1–9, 2000.
- Wójcik, C. und DeMartino, G. N.: Intracellular localization of proteasomes. In: *Int J Biochem Cell Biol*, Band 35:S. 579–589, 2003.
- Wollerton, M. C., Gooding, C., Wagner, E. J., Garcia-Blanco, M. A. und Smith, C. W. J.: Autoregulation of polypyrimidine tract binding protein by alternative splicing leading to nonsense-mediated decay. In: *Mol Cell*, Band 13:S. 91–9100, 2004.
- Yang, E., van Nimwegen, E., Zavolan, M., Rajewsky, N., Schroeder, M., Magnasco, M. und Darnell, J. E.: Decay rates of human mRNAs: correlation with functional characteristics and sequence attributes. In: *Genome Res*, Band 13:S. 1863–1872, 2003.
- Yang, M., Omura, S., Bonifacino, J. S. und Weissman, A. M.: Novel aspects of degradation of T cell receptor subunits from the endoplasmic reticulum (ER) in T cells: Importance of oligosaccharide processing, ubiquitination, and proteasome-dependent removal from ER membranes. In: *J Exp Med*, Band 187:S. 835–846, 1998.

- Yeo, G., Holste, D., Kreiman, G. und Burge, C. B.: Variation in alternative splicing across human tissues. In: *Genome Biol*, Band 5:S. R74–R74, 2004.
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Natsukawa, T., Shinobu, N., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Akira, S. und Fujita, T.: The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. In: *Nat Immunol*, Band 5:S. 730–737, 2004.
- Zaiß, D. M. W.: *Untersuchungen zur Funktion regulatorischer Proteine des 20S Proteasoms*. Dissertation, Charité-Institut für Biochemie, Berlin, 2000.
- Zaiß, D. M. W., Standera, S., Holzhütter, H., Kloetzel, P. M. und Sijts, A. J.: The proteasome inhibitor PI31 competes with PA28 for binding to 20S proteasomes. In: *FEBS Lett*, Band 457:S. 333–338, 1999.
- Zaiß, D. M. W., Standera, S., Kloetzel, P. M. und Sijts, A. J.: PI31 is a modulator of proteasome formation and antigen processing. In: *Proc Natl Acad Sci U S A*, Band 99:S. 14344–14349, 2002.
- Zavolan, M., Kondo, S., Schonbach, C., Adachi, J., Hume, D. A., Hayashizaki, Y. und Gaasterland, T.: Impact of alternative initiation, splicing, and termination on the diversity of the mRNA transcripts encoded by the mouse transcriptome. In: *Genome Res*, Band 13:S. 1290–1300, 2003.
- Zhang, T., Kruys, V., Huez, G. und Gueydan, C.: AU-rich element-mediated translational control: Complexity and multiple activities of trans-activating factors. In: *Biochem Soc Trans*, Band 30:S. 952–958, 2002.

Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Peter-Michael Kloetzel dafür bedanken, daß er mir dieses überaus interessante Thema anvertraut hat und es mir ermöglichte, in seiner Arbeitsgruppe unter hervorragenden Bedingungen zu arbeiten. Dr. Elke Krüger danke ich für die intensive Betreuung meiner Arbeit, die Tipps und Anregungen und ihre ständige Diskussionsbereitschaft. Allen Mitarbeitern des Krüger Labors sei für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die Unterstützung bei etlichen Versuchen gedankt. Daß ich meine Tätigkeit in der AG Kloetzel in sehr guter Erinnerung behalten werde, habe ich auch allen anderen Mitarbeitern zu verdanken, die mir ihre Unterstützung, Hilfe und Aufmunterung in den Jahren zuteil kommen ließen.

Ein ganz großes Dankeschön geht an alle Doktoranden der AG Kloetzel, mit denen ich eine schöne Zeit im Labor und außerhalb des Instituts verbringen durfte, und die mich auch während meiner selbstgewählten Isolation im „Kellerloch“ und zu Hause nicht vergaßen. Ganz besonders möchte ich Nicole Lange danken, die mich durch ihr herzerfrischendes, fröhliches Gemüt so manches Mal wieder aufgebaut hat und auch mal mit anderthalbminütiger Vorankündigung spontan an meiner Haustür klingelte. Ein herzlicher Dank geht an Melanie Rieger als Leidensgenossin der letzten Monate und kritischen Korrekturleserin, durch deren Unterstützung und Ideen meine Arbeit nun endlich dem Wohle der Menschheit dienen kann.

Meinen Freunden danke ich für die schönen, teils entspannenden Stunden außer Sichtweite des Labors, die mir halfen, kurzzeitig die Gedanken an die Arbeit zu unterdrücken und einfach mal das Leben zu genießen. Dabei sorgte Christiane Schmidt immer wieder für eine ungemein heitere Atmosphäre. Besonders sei meine liebe Annelie erwähnt, ohne deren Hilfe ich es sicher nicht soweit gebracht hätte.

Zu guter Letzt bedanke ich mich bei meinen Eltern, die mir das alles erst ermöglichten, für ihren Rückhalt und ihre Unterstützung in jeglicher Hinsicht und natürlich für ihre Geduld.

Publikationsliste

Backert S., Schwarz T., Miehle S., Kirsch C., Sommer C., Kwok T., Gerhard M., Goebel U.B., Lehn N., Koenig W., Meyer T.F.: *Functional analysis of the cag pathogenicity island in Helicobacter pylori isolates from patients with gastritis, peptic ulcer and gastric cancer.*
In: *Infect Immun.*, Band Feb;72(2):S. 1043–56, 2004.

Selbständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, die Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt zu haben.

Berlin, im August 2008